

KOMISSIO ASETUS (EU) N:o 51/2013,**annettu 16 päivänä tammikuuta 2013,****asetuksen (EY) N:o 152/2009 muuttamisesta siltä osin kuin on kyse rehujen sisältämien eläinperäisten ainesosien määrittämenetelmistä rehujen virallista valvontaa varten****(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)**

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon rehu- ja elintarvikelainsäädännön sekä eläinten terveyttä ja hyvinvointia koskevien sääntöjen mukaisuuden varmistamiseksi suoritettua virallisesta valvonnasta 29 päivänä huhtikuuta 2004 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 882/2004 ⁽¹⁾ ja erityisesti sen 11 artiklan 4 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Tiettyjen tarttuvien spongiformisten enkefalopatioiden ehkäisyä, valvontaa ja hävittämistä koskevista säännöistä 22 päivänä toukokuuta 2001 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 999/2001 ⁽²⁾ 7 artiklan 1 kohdassa säädetään, että eläinvalkuaisen käyttö märehtijöiden ruokinnassa on kielletty. Kieltoa on laajennettu siten, että se koskee myös muita eläimiä kuin märehtijöitä; lisäksi kieltoa on kyseisille eläimille syötettävien eläinperäisten tuotteiden osalta rajoitettu kyseisen asetuksen liitteen IV mukaisesti.

(2) Muiden kuin ihmisravinnoksi tarkoitettujen eläimistä saatavien sivutuotteiden ja niistä johdettujen tuotteiden terveysnäkökohdista sekä asetuksen (EY) N:o 1774/2002 kumoamisesta 21 päivänä lokakuuta 2009 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1069/2009 ⁽³⁾ 11 artiklan 1 kohdassa kielletään turkiseläimiä lukuun ottamatta maaeläinlajin ruokkiminen saman lajin eläinten ruhoista tai ruhonosista johdetulla käsitellyllä eläinvalkuaisella sekä viljeltyjen kalojen ruokkiminen samaa lajia olevien viljeltyjen kalojen ruumiista tai ruumiinosista johdetulla käsitellyllä eläinvalkuaisella.

(3) Näytteenotto- ja määrittämenetelmistä rehujen virallista valvontaa varten 27 päivänä tammikuuta 2009 annetun komission asetuksen (EY) N:o 152/2009 ⁽⁴⁾ liitteessä VI

vahvistetaan rehujen sisältämien eläinperäisten ainesosien määrittämenetelmät rehujen virallista valvontaa varten. Mikroskooppinen menetelmä on tällä hetkellä ainoa validoitu menetelmä, jolla eläinvalkuaisen esiintyminen rehussa voidaan havaita; sillä pystytään erottamaan toisistaan maaeläimistä peräisin olevien ainesosien esiintyminen ja kaloista peräisin olevien ainesosien esiintyminen; sillä ei kuitenkaan voida kvantifioida riittävän tarkasti eläinperäisten ainesosien määrää rehussa, ja sen vuoksi sitä ei pitäisi käyttää tähän tarkoitukseen.

(4) EU:n vertailulaboratorio on validoinut uuden polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvan menetelmän eläinvalkuaisen havaitsemiseksi rehusta. Jäsenvaltioiden kansallisten vertailulaboratorioiden kanssa järjestetty täytäntöönpanoa koskeva tutkimus osoitti, että uusi menetelmä on riittävän kestävä viralliseksi valvontamenetelmäksi unionissa. Uudella menetelmällä pystytään havaitsemaan eläinperäisten ainesosien esiintyminen rehussa ja tunnistamaan laji, josta kyseiset ainesosat ovat peräisin. Olisi erittäin hyödyllistä käyttää tätä uutta menetelmää yhdessä mikroskooppisen menetelmän kanssa tai, tapauksen mukaan, sen sijasta valvottaessa asetuksissa (EY) N:o 999/2001 ja (EY) N:o 1069/2009 säädettyjen ruokintaa koskevien kieltojen asianmukaista täytäntöönpanoa.

(5) Sen vuoksi asetuksen (EY) N:o 152/2009 liite VI olisi korvattava vastaavasti.

(6) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat elintarviketurvallisuuden ja eläinten terveyden käsittelevän pysyvän komitean lausunnon mukaiset, eikä Euroopan parlamentti tai neuvosto ole vastustanut niitä,

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Korvataan asetuksen (EY) N:o 152/2009 liite VI tämän asetuksen liitteessä olevalla tekstillä.

⁽¹⁾ EUVL L 165, 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ EYVL L 147, 31.5.2001, s. 1.

⁽³⁾ EUVL L 300, 14.11.2009, s. 1.

⁽⁴⁾ EUVL L 54, 26.2.2009, s. 1.

2 artikla

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

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 16 päivänä tammikuuta 2013.

Komission puolesta
Puheenjohtaja
José Manuel BARROSO

LIITE

"LIITE VI

REHUIEN SISÄLTÄMIEN ELÄINPERÄISTEN AINESOSIEN MÄÄRITYSMENETELMÄT REHUIEN VIRALLISTA VALVONTAA VARTEN**1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA**

Rehujen eläinperäiset ainesosat olisi määritettävä valomikroskopiolla tai polymeraasiketjureaktiolla (PCR) tässä liitteessä vahvistettujen säännösten mukaisesti.

Näillä kahdella menetelmällä on mahdollista havaita eläinperäisten ainesosien esiintyminen rehuaineissa ja rehuseoksissa. Niillä ei kuitenkaan ole mahdollista laskea kyseisten ainesosien määrää rehuaineissa ja rehuseoksissa. Kummankin menetelmän toteamisraja on alle 0,1 % (w/w).

PCR-menetelmän ansiosta rehuaineissa ja rehuseoksissa esiintyvien eläinperäisten ainesosien taksonominen ryhmä on mahdollista tunnistaa.

Näitä menetelmiä on käytettävä valvottaessa asetuksen (EY) N:o 999/2001 7 artiklan 1 kohdassa ja liitteessä IV sekä asetuksen (EY) N:o 1069/2009 11 artiklan 1 kohdassa säädettyjen kieltojen täytäntöönpanoa.

Näitä menetelmiä voidaan käyttää joko yksin tai yhdessä testattavasta rehutyyppistä riippuen yhden operatiivisen protokollan puitteissa rehuissa esiintyvää eläinproteiinia käsittelevän EU:n vertailulaboratorion (EURL-AP) laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden (Standard Operating Procedures, SOP) ⁽¹⁾ mukaisesti.

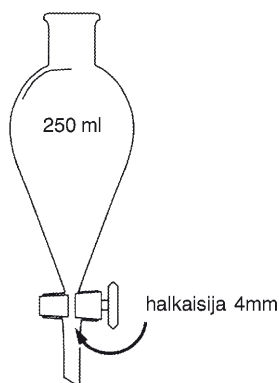
2. MENETELMÄT**2.1 Valomikroskopia****2.1.1 Periaate**

Määritettäväksi lähetetyissä rehuaineissa ja rehuseoksissa mahdollisesti esiintyvät eläinperäiset ainesosat tunnistetaan tyypillisten mikroskooppisesti tunnistettavissa olevien ominaisuuksien, kuten lihassäikeiden ja muiden lihan palojen, ruston, luiden, sarvien, karvojen, harjasten, veren, höyhenten, munankuorten, kalanluiden ja suomujen, perusteella.

2.1.2 Reagenssit ja laitteet**2.1.2.1 Reagenssit****2.1.2.1.1 Konsentrintireagenssi****2.1.2.1.1.1 Tetrakloorietyleeni (suhteellinen tiheys 1,62).****2.1.2.1.2 Värjäysreagenssi****2.1.2.1.2.1 Alitsariinipunaliuos (laimennetaan 2,5 ml:aa 1 M:n kloorivetyhappoa 100 ml:aan vettä ja lisätään liuokseen 200 mg alitsariinipunaista).****2.1.2.1.3 Kiinnitysreagenssit****2.1.2.1.3.1 Lipeä (NaOH 2,5 % w/v tai KOH 2,5 % w/v).****2.1.2.1.3.2 Glyseroli (laimentamaton, viskositeetti: 1 490 cP).****2.1.2.1.3.3 Norland ® Optical Adhesive 65 (viskositeetti: 1 200 cP) tai hartsi, jolla on kestopreparaatin valmistukseen soveltuvat ominaisuudet.****2.1.2.1.4 Kiinnitysreagenssit, joilla on värjäysominaisuuksia****2.1.2.1.4.1 Lugolin liuos (2 g kaliumjodidia liuotetaan 100 ml:aan vettä ja lisätään 1 g jodia ja sekoitetaan useita kertoja).**

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2 Kystiiniareagenssi (2 g lyijyasetaattia, 10 g NaOH/100 ml vettä).
- 2.1.2.1.4.3 Fehlingin liuos (valmistetaan ennen käyttöä kahdesta samansuuruisesta osasta (1/1) varastoliuosta A ja B. Liuos A: liuotetaan 6,9 g:aa kupari(II)sulfaattipentahydraattia 100 ml:aan vettä. Liuos B: liuotetaan 34,6 g:aa kaliumnatriumtartraattitetrahydraattia ja 12 g:aa NaOH:ta 100 ml:aan vettä).
- 2.1.2.1.4.4 Tetrametyylibentsidiini/vetyperoksidi (liuotetaan 1 g 3,3',5,5'-tetrametyylibentsidiiniä (TMB) 100 ml:aan jäätikkää ja 150 ml:aan vettä. Ennen käyttöä 4 osaa TMB-liuosta sekoitetaan yhteen osaan 3-prosenttista vetyperoksidia).
- 2.1.2.1.5 Pesureagenssit
- 2.1.2.1.5.1 Etanoli $\geq 96\%$ (tekninen laatu).
- 2.1.2.1.5.2 Asetoni (tekninen laatu).
- 2.1.2.1.6 Värinpoistoreagenssi
- 2.1.2.1.6.1 Kaupallinen natriumhypokloriittiliuos (9–14 % aktiivista klooria).
- 2.1.2.2 Laitteet
- 2.1.2.2.1 Analyysivaaka, tarkkuus 0,001 g.
- 2.1.2.2.2 Jauhamisvälineet: mylly tai huhmare.
- 2.1.2.2.3 Seulat, joissa on neliömuotoiset reiät, silmäkoko 0,25 mm ja 1 mm.
- 2.1.2.2.4 Kartiomainen erotussuppilo, lasia, 250 ml, jonka pohjalla on teflon- tai lasiioshana sulkutulppana. Sulkutulpan halkaisijan on oltava avattuna ≥ 4 mm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kartiopohjaista selkeytysastiaa, jos laboratorio on osoittanut, että toteamisrajat ovat vastaavia kuin lasista kartionmuotoista erotussuppiloa käytettäessä.

Erotussuppilo

- 2.1.2.2.5 Stereomikroskooppi, jonka suurennusväli on ainakin 6,5×–40×.
- 2.1.2.2.6 Lämpövalaisumikroskooppi, jonka suurennusväli on vähintään 100×–400×. Lisäksi voidaan käyttää polarisointua valomikroskopiaa ja differentiaali-interferenssikontrastimikroskopiaa.
- 2.1.2.2.7 Tavanomaiset laboratorion lasiastiat
- 2.1.2.2.8 Objektilasien valmisteluvälineet: tavalliset objektilasit, objektilasit, joissa on syvennys, peitelasit (20 × 20 mm), pinsetit, ohut spaatteli.
- 2.1.3 *Näytteenotto ja näytteiden valmistelu*
- 2.1.3.1 *Näytteenotto*
- Käytetään liitteen I säännösten mukaisesti otettua edustavaa näytettä.

2.1.3.2 Varotoimenpiteet

Ristikontaminaation välttämiseksi laboratoriossa kaikki uudelleenkäytettävät välineet on puhdistettava huolellisesti ennen käyttöä. Erotussuppilon osat on irrotettava ennen puhdistusta. Erotussuppilon osat ja lasiastiat on esipestävä käsin ja sen jälkeen pestävä astianpesukoneessa. Seulat on puhdistettava jäykkäharjaisella synteettisellä harjalla. Rasvaisten aineiden, kuten kalajauhon, seulonnan jälkeen suositetaan, että seulat puhdistetaan asetonilla ja paineilmalla.

2.1.3.3 Muiden kuin rasva- tai öljynäytteiden esikäsittely

2.1.3.3.1 Näytteen kuivaus: Näytteet, joiden kosteuspitoisuus on > 14 %, on kuivattava ennen käsittelyä.2.1.3.3.2 Näytteen esiseulonta: Suositetaan, että pelletoitu rehu ja jyvät esiseulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 1 mm, ja saadut kaksi fraktiota valmistetaan ja määritetään erillisinä näytteinä.2.1.3.3.3 Osanäytteen otto ja jauhaminen: Osanäytteeksi otetaan vähintään 50 g näytteestä ja jauhetaan.2.1.3.3.4 Sedimentin uutto ja valmistus: 10 g:n annos (0,01 g:n tarkkuudella) jauhettua osanäytettä siirretään erotussuppilon tai kartiopohjaiseen selkeytysastiaan, minkä jälkeen siihen lisätään 50 ml tetrakloorietyleeniä. Erotussuppilon siirrettävä annos saa olla enintään 3 g, jos kyseessä on kalajauho tai muu puhtaasti eläintuote, kivennäisaineos tai esiseos, joka tuottaa yli 10 prosenttia sedimenttiä. Seosta ravistetaan voimakkaasti ainakin 30 sekuntia, minkä jälkeen siihen lisätään varovasti vähintään 50 ml tetrakloorietyleeniä samalla kun suppilon sisäpinta pestään siihen mahdollisten tarttuneiden partikkelien poistamiseksi. Saadun seoksen annetaan laskeutua astian pohjalle vähintään viisi minuuttia, minkä jälkeen sedimentti erotetaan avaamalla sulku tulppa.

Jos käytetään kartiopohjasta selkeytysastiaa, seosta sekoitetaan voimakkaasti vähintään 15 sekunnin ajan ja mahdolliset astian seinämien sisäpintaan tarttuneet partikkelit pestään huolellisesti pois vähintään 10 ml:lla puhdasta tetrakloorietyleeniä. Seoksen annetaan laskeutua kolmen minuutin ajan, minkä jälkeen sitä sekoitetaan taas 15 sekunnin ajan ja mahdolliset astian seinämien sisäpintaan tarttuneet partikkelit pestään huolellisesti pois vähintään 10 ml:lla puhdasta tetrakloorietyleeniä. Saadun seoksen annetaan laskeutua vähintään 5 minuutin ajan, minkä jälkeen nestemäinen fraktio poistetaan ja heitetään pois huolellisesti dekantimalla samalla kun huolehditaan siitä, ettei sedimenttiä menetetä.

Sedimentti kuivataan ja punnitaan 0,001 g:n tarkkuudella. Jos yli 5 prosenttia sedimentistä koostuu > 0,50 mm:n suuruisista partikkeleista, se seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm:n, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.

2.1.3.3.5 Näytteen kelluvan osan, flotaatin, erottaminen ja esikäsittely: Edellä kuvatulla menetelmällä tehdyn sedimentin talteenoton jälkeen erotussuppilon pitäisi jäädä kaksi osaa: tetrakloorietyleenistä koostuva nestemäinen osa ja kelluvasta aineksesta muodostuva kiinteä osa. Tätä kiinteää osaa kutsutaan flotaatiksi, ja se otetaan talteen avaamalla suppilon tulppa ja kaatamalla tetrakloorietyleeni pois. Erotussuppilo käännetään ylösalaisin ja flotaatti siirretään suureen petrimaljaan ja kuivataan ilmassa vetokaapissa. Jos yli viisi prosenttia flotaatista koostuu partikkeleista, jotka ovat > 0,50 mm, se seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.2.1.3.3.6 Raaka-aineen esikäsittely: Valmistetaan vähintään 5 g:n annos jauhettua osanäytettä. Jos yli viisi prosenttia aineksesta koostuu partikkeleista, jotka ovat > 0,50 mm, se seulotaan 0,25 mm:n seulalla ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.

2.1.3.4 Rasvasta tai öljystä koostuvien näytteiden esikäsittely

Rasvasta tai öljystä koostuvien näytteiden esikäsittelyssä on noudatettava seuraavaa menettelyä:

— Jos rasva on kiinteää, sitä lämmitetään uunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.

— 40 ml rasvaa tai öljyä pipetoidaan näytteen pohjasta sentrifugiputkeen.

— Sentrifugoidaan 10 minuuttia nopeudella 4 000 kierrosta minuutissa (rpm).

— Jos rasva on jähmettynyt sentrifugoinnin aikana, sitä lämmitetään uunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.

— Sentrifugoidaan uudestaan 5 minuuttia nopeudella 4 000 kierrosta minuutissa (rpm).

— Puolet dekantoiduista epäpuhtauksista siirretään pienellä lusikalla tai spaattelilla objektilasille mikroskooppista tutkimusta varten; kiinnitysreagenssiksi suositetaan glyserolia.

— Loput epäpuhtauksista käytetään sedimentin valmisteluun 2.1.3.3 kohdassa kuvatulla tavalla.

2.1.3.5 Värjäysreagenssien käyttö

Eläinperäisten ainesosien oikean tunnistamisen helpottamiseksi laboratorio voi käyttää näytteen valmistuksessa värjäysreagensseja EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien ohjeiden mukaisesti.

Jos sedimentin värjäämiseen käytetään alitsariinipunaliuosta, noudatetaan seuraavaa menettelyä:

— Kuivattu sedimentti siirretään lasiseen koeputkeen ja pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan ja annetaan liuottimen selkeytyä noin yhden minuutin ja 30 sekunnin ajan ennen sen dekantointia).

— Sedimentti käsitellään värinpoistoreagenssilla lisäämällä sedimenttiin vähintään 1 ml natriumhypokloriittiliuosta. Reaktion annetaan jatkua 10 minuutin ajan. Putki täytetään vedellä, sedimentin annetaan laskeutua 2–3 minuutin ajan, ja sen jälkeen vesi ja suspendoituneet partikkelit dekantoidaan kevyesti.

— Sedimentti pestään vielä kahdesti noin 10 ml:lla vettä (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan, sedimentin annetaan laskeutua putken pohjaan ja vesi dekantoidaan).

— Lisätään alitsariinipunaliuosta 2–10 tippaa ja sekoitetaan seosta koeputkisekoittimella. Sedimentin annetaan reagoida liuoksen kanssa 30 sekunnin ajan, ja värjäytynyt sedimentti pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia ja sen jälkeen kerran asetonilla (joka kerta käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan ja annetaan liuottimen selkeytyä noin minuutin ajan, minkä jälkeen liuos dekantoidaan).

— Värjäytynyt sedimentti kuivataan.

2.1.4 Mikrokooppitutkimus

2.1.4.1 Objektilasin valmistelu

Objektilasit valmistellaan sedimentistä ja laboratorion valinnan mukaan joko flotaatista tai raaka-aineesta. Jos näytteen valmistelussa on käytetty seulontaa, tuloksena saadut kaksi fraktiota (hieno ja karkea) valmistellaan. Objektilasille levitettävien fraktion testinäytteiden on oltava koko fraktiota edustavia.

Objektilaseja on valmisteltava riittävä määrä sen varmistamiseksi, että 2.1.4.2 kohdassa säädettyä tutkimusprotokollaa voidaan noudattaa kokonaisuudessaan.

Objektilaseilla on käytettävä riittävästi kiinnitysreagenssia EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti. Objektilaseilla käytetään peitinlaseja.

2.1.4.2 Tutkimusprotokollat rehuseosten ja rehuaineiden sisältämien eläimestä peräisin olevien partikkelien havaitsemiseksi

Valmisteltuja objektilaseja on tutkittava mikroskoopilla noudattaen muita rehuseoksia ja rehuaineita kuin puhdasta kalajauhoa koskevassa kaaviossa 1 esitettyä tutkimusprotokollaa tai puhdasta kalajauhoa koskevassa kaaviossa 2 esitettyä tutkimusprotokollaa.

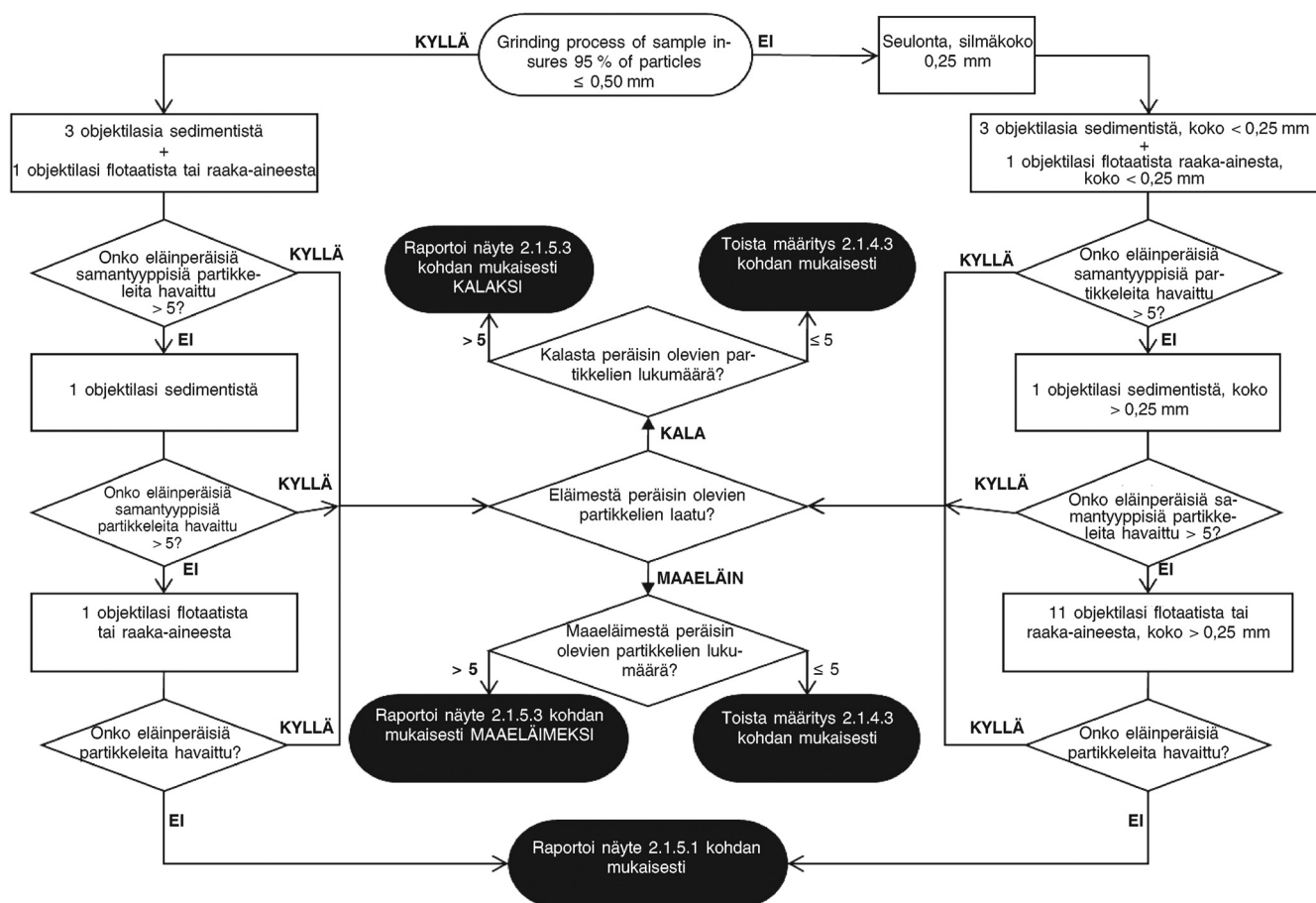
Mikroskooppitutkimus suoritetaan läpivalaisumikroskoopilla tutkimalla sedimenttiä ja laboratorion valinnan mukaan flotaattia tai raaka-ainetta. Karkeita fraktioita voidaan läpivalaisumikroskoopin lisäksi tutkia stereomikroskoopilla. Jokainen objektilasi tutkitaan läpikotaisin eri suurennuksilla.

Kussakin tutkimusprotokollan vaiheessa havainnoitavien objektilasien vähimmäismäärää on noudatettava tarkasti, paitsi jos määrättyä objektilasimäärää ei ole mahdollista saavuttaa fraktioaineksen koon vuoksi. Havainnoinnin kohteena saa olla enintään kuusi objektilasia määritystä kohti.

Jotta partikkelien tyyppi ja alkuperä olisi helpompi tunnistaa, laboratorio voi käyttää apuvälineitä, esimerkiksi päätöksentekoa tukevia järjestelmiä, kuvakirjastoja ja vertailunäytteitä.

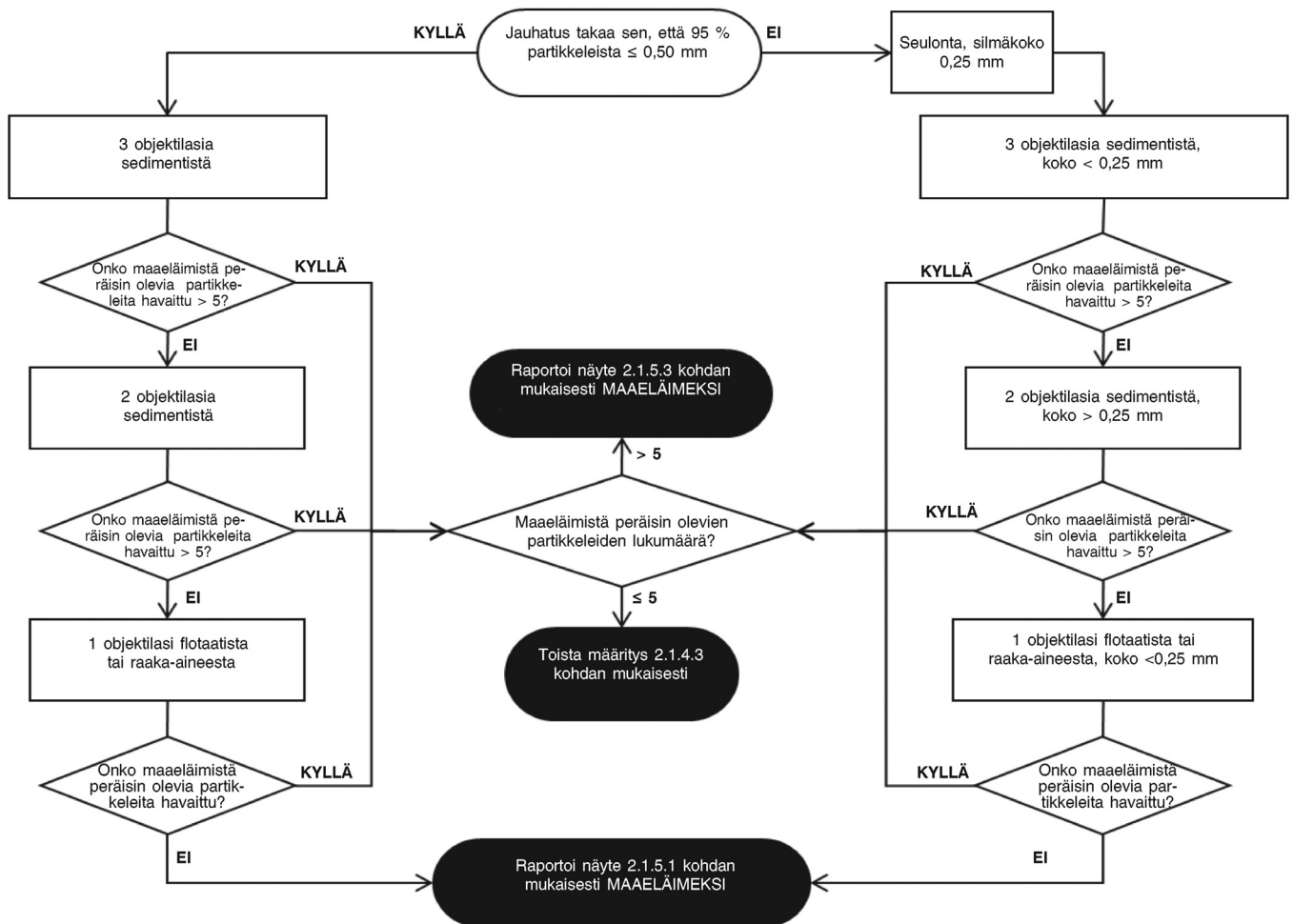
Kaavio 1

Tutkimusprotokolla muiden rehuseosten ja rehuaineiden kuin kalajauhon sisältämien eläinperäisten partikkelien havaitsemiseksi



Kaavio 2

Tutkimusprotokolla kalajauhon sisältämien eläinperäisten partikkelien havaitsemiseksi



2.1.4.3 Määrittysten lukumäärä

Jos kaaviossa 1 tai 2 vahvistetun tutkimusprotokollan mukaisesti suoritettua ensimmäisen määrittelyn jälkeen ei havaita kyseisyyppisiä eläinperäisiä eli maaeläimistä tai kalasta peräisin olevia partikkeleita, lisämääritys ei ole tarpeen, ja määrittelyn tulos raportoidaan 2.1.5.1 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen.

Jos kaaviossa 1 tai 2 vahvistetun tutkimusprotokollan mukaisesti suoritettua ensimmäisen määrittelyn jälkeen kyseisyyppisiä eläinperäisiä eli maaeläimistä tai kalasta peräisin olevia partikkeleita havaitaan yhteensä 1–5, suoritetaan uudesta 50 gramman osanäytteestä toinen määrittely. Jos tämän toisen määrittelyn jälkeen kyseisyyppisten eläinperäisten partikkelien määrän havaitaan vaihtelevan välillä 0–5, analyysin tulos raportoidaan 2.1.5.2 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen tai tehdään uudesta 50 gramman osanäytteestä kolmas määrittely. Jos kuitenkin ensimmäisen ja toisen määrittelyn jälkeen kahden määrittelyn aikana havaittujen kyseisyyppisten partikkelien summa on suurempi kuin 15, lisämääritystä ei tarvita, ja määrittelyn tulos raportoidaan suoraan 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen. Jos kolmannen määrittelyn jälkeen kaikissa kolmessa määrittelyssä havaittujen kyseisyyppisten eläinperäisten partikkelien summa on yhteensä suurempi kuin 15, määrittelyn tulos ilmoitetaan 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen. Muussa tapauksessa määrittelyn tulos raportoidaan 2.1.5.2 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen.

Jos kaaviossa 1 tai kaaviossa 2 vahvistetun tutkimusprotokollan mukaisesti suoritettua ensimmäisen määrittelyn jälkeen kyseisyyppisiä eläinperäisiä eli maaeläimistä tai kalasta peräisin olevia partikkeleita havaitaan yli viisi, määrittelyn tulos raportoidaan 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua terminologiaa käyttäen.

2.1.5 Tulosten ilmoittaminen

Laboratorion on tuloksista raportoidessaan ilmoitettava mistä aineksesta määrittely on tehty (sedimentti, flotaatti, raaka-aine) ja kuinka monta määrittelyä tehtiin.

Laboratorion raportin on sisällettävä ainakin tieto maaeläimistä ja kalasta peräisin olevien ainesosien esiintymisestä.

Eri tuloksista raportoidaan seuraavasti:

2.1.5.1 Kyseisyyppistä eläinperäistä partikkelia ei havaittu:

— Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu maaeläimistä peräisin olevia partikkeleita.

— Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu kalasta peräisin olevia partikkeleita.

2.1.5.2 Kyseisyyppisiä eläinperäisiä partikkeleita havaittu keskimäärin 1–5:

— Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu maaeläimistä peräisin olevia partikkeleita keskimäärin enempää kuin viisi määrittelyä kohti. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [luut, rustot, lihas, karva, sarvi ...]. Tämä vähäinen määrä on mikroskooppisen menetelmän toteamisrajan alapuolella, mikä tarkoittaa sitä, että väärä positiivinen tulos on mahdollinen.

tai, tapauksen mukaan,

— Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu kalasta peräisin olevia partikkeleita keskimäärin enempää kuin 5 määrittelyä kohti. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi: ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus ...]. Tämä vähäinen määrä on mikroskooppisen menetelmän toteamisrajan alapuolella, mikä tarkoittaa sitä, että väärä positiivinen tulos on mahdollinen.

Jos näyte esiselutetaan, laboratorion on mainittava raportissaan fraktio (seulottu fraktio, pelletoitu fraktio tai jyvät), josta eläinperäiset partikkelit on havaittu, sillä jos eläinperäisiä partikkeleita havaitaan ainoastaan seulotusta fraktiosta, kyse saattaa olla ympäristön epäpuhtauksista.

2.1.5.3 Kyseisyyppisiä eläinperäisiä partikkeleita havaittu keskimäärin enemmän kuin viisi

— Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin maaeläimistä peräisin olevia partikkeleita keskimäärin enemmän kuin viisi määrittelyä kohti. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi: ... [luu, rusto, lihas, karva, sarvi ...].

tai, tapauksen mukaan,

- Valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin kalasta peräisin olevia partikkeleita keskimäärin enemmän kuin viisi määritystä kohti. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi:... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus ...].

Jos näyte esiseulotaan, laboratorion on mainittava raportissaan fraktio (seulottu fraktio, pelletoitu fraktio tai jyvät), josta eläinperäiset partikkelit on havaittu, sillä jos eläinperäisiä partikkeleita havaitaan ainoastaan seulotusta fraktiosta, kyse saattaa olla ympäristön epäpuhtauksista.

2.2 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

2.2.1 Periaate

Eläinperäisiä deoksiribonukleiinihapon (DNA) fragmentteja, joita rehuaineissa ja rehuseoksissa saattaa esiintyä, havainnoidaan geneettisellä amplifikaatiotekniikalla (PCR-tekniikalla), joka kohdennetaan lajikohtaisiin DNA-sekvensseihin.

PCR-menetelmä edellyttää ensiksi DNA:n eristysvaihetta. Seuraavassa vaiheessa näin eristetty DNA amplifoidaan määrittäksen kohteena olevan eläinlajin havaitsemiseksi.

2.2.2 Reagenssit ja välineet

2.2.2.1 Reagenssit

2.2.2.1.1 Reagenssit DNA:n eristysvaihetta varten

Ainoastaan reagensseja, jotka EURL-AP on hyväksynyt ja verkkosivuillaan julkaissut, saa käyttää.

2.2.2.1.2 Reagenssit geneettistä amplifikaatiovaihetta varten

2.2.2.1.2.1 Alukset ja koettimet

Ainoastaan alukkeita ja koettimia, joiden oligonukleotidisekvenssit EURL-AP on validoinut, saa käyttää ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2 Master Mix

Ainoastaan Master Mix -liuoksia, jotka eivät sisällä reagensseja, jotka saattavat johtaa eläin-DNA:n esiintymisen vuoksi vääriin tuloksiin, saa käyttää ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3 Dekontaminaatioreagenssit.

2.2.2.1.2.3.1 Suolahappoliuos (0,1N).

2.2.2.1.2.3.2 Natriumhypokloriittiliuos (0,15 % aktiivista klooria).

2.2.2.1.2.3.3 Syövyttämättömät reagenssit kalliiden laitteiden, kuten analyysivaakojen (esim. MP Biomedicals -yrityksen tuote DNA EraseTM) dekontaminointiin.

2.2.2.2 Laitteet

2.2.2.2.1 Analyysivaaka, tarkkuus 0,001 g.

2.2.2.2.2 Jauhamisvälineet.

2.2.2.2.3 Lämpöblokki, joka mahdollistaa reaaliaikaisen polymeraasiketjureaktion (PCR)

2.2.2.2.4 Mikrosentrifugi mikrofugiputkia varten.

2.2.2.2.5 Mikropipettejä, joilla voidaan pipetoida tilavuudeltaan 1–1 000 µl:n näytteitä.

2.2.2.2.6 Molekyylibiologiassa käytettävät tavanomaiset muoviastiat: mikrofugiputket, suodattimelliset mikropipettien muovikärjet, lämpöblokkiin soveltuvat levyt.

2.2.2.2.7 Pakastimet näytteiden ja reagenssien säilytystä varten.

⁽¹⁾ Luettelo näistä määrittäksen kohteena oleville kullekin eläinlajille vahvistetuista koettimista ja alukkeista on saatavana EURL-AP:n verkkosivustolla.

⁽²⁾ Esimerkkejä toimivista Master Mix -liuoksista on saatavana EURL-AP:n verkkosivustolla.

2.2.3 Näytteenotto ja näytteiden valmistus

2.2.3.1 Näytteenotto

Käytetään liitteen I säännösten mukaisesti otettua edustavaa näytettä.

2.2.3.2 Näytteen valmistus

Laboratorionäytteet on esikäsitteltävä DNA:n eristämistä varten liitteessä II vahvistettujen vaatimusten mukaisesti. Vähintään 50 grammaa näytettä on jauhettava määritystä varten.

Näytteen valmistus on tehtävä eri huoneissa kuin DNA:n eristys ja geneettinen amplifikaatioreaktio ISO 24276 -standardissa kuvatulla tavalla.

Valmistetaan vähintään kaksi 100 mg:n suuruista testinäytettä.

2.2.4 DNA:n eristäminen

DNA eristetään näytteistä, jotka on esikäsitelty EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti.

Jokaista DNA:n eristyskertaa kohti tehdään kaksi eristyskontrollia ISO 24276 -standardissa kuvatulla tavalla:

- negatiivinen DNA-eristyskontrolli,
- positiivinen DNA-eristyskontrolli.

2.2.5 Geneettinen amplifikaatio

Geneettinen amplifikaatio suoritetaan kullekin tunnistettavalle lajille validoitua menetelmää käyttäen. Nämä menetelmät on vahvistettu EURL-AP:n laatimissa ja verkkosivuillaan julkaisemissa toimintaohjeissa. Kukin eristetty DNA on määritettävä vähintään kahtena eri laimennoksena, jotta inhibitio voidaan arvioida.

Jokaista kohdelajia kohti tehdään kaksi amplifikaatiokontrollia ISO 24276 -standardissa kuvatulla tavalla:

- kohteen positiivinen DNA-kontrolli kullekin PCR-ajolle tai PCR-testisarjalle,
- amplifikaation reagenssikontrolli (ilman DNA-templaattia NTC) kullekin PCR-ajolle tai PCR-testisarjalle.

2.2.6 Tulosten tulkinta ja esittäminen

Laboratorion on tuloksista raportoidessaan ilmoitettava ainakin käytettyjen testinäytteiden paino, käytetty eristystekniikka, suoritettujen määritysten määrä ja menetelmän toteamisraja.

Tuloksia ei saa tulkita eikä raportoida, jos testin kohteesta ei positiivisessa DNA-eristyskontrollissa ja kohteen positiivisessa DNA-kontrollissa saada positiivisia tuloksia kun taas amplifikaation reagenssikontrolli on negatiivinen.

Jos kahdesta testinäytteestä saadut tulokset eivät ole yhdenmukaisia, ainakin geneettinen amplifikaatio on toistettava. Jos laboratorio epäilee, että epäyhdenmukaisuus voi johtua eristetystä DNA:sta, DNA:n eristys ja geneettinen amplifikaatio on tehtävä uudelleen ennen tulosten tulkittamista.

Lopullisten raportoitavien tulosten on perustuttava kyseisestä kahdesta testinäytteestä saatujen tulosten yhdistämiseen ja tulkintaan EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti.

2.2.6.1 Negatiivinen tulos

Negatiivinen tulos on raportoitava seuraavasti:

Laboratorioon toimitetussa näytteessä ei todettu yhtään X:n DNA:ta (X on testin kohteena oleva eläinlaji tai eläinlajiryhmä).

2.2.6.2 Positiivinen tulos

Positiivinen tulos raportoidaan seuraavasti:

Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin X:n DNA:ta (X on testin kohteena oleva eläinlaji tai eläinlajiryhmä)."