

RÈGLEMENT (UE) N° 51/2013 DE LA COMMISSION

du 16 janvier 2013

modifiant le règlement (CE) n° 152/2009 en ce qui concerne les méthodes d'analyse applicables en matière d'identification des constituants d'origine animale pour le contrôle officiel des aliments pour animaux

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux ⁽¹⁾, et notamment son article 11, paragraphe 4,

considérant ce qui suit:

(1) L'article 7, paragraphe 1, du règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles ⁽²⁾ dispose que l'utilisation de protéines animales dans l'alimentation des ruminants est interdite. Cette interdiction est étendue aux animaux autres que les ruminants et limitée, en ce qui concerne l'alimentation de ces animaux avec des produits d'origine animale, conformément à l'annexe IV de ce règlement.

(2) L'article 11, paragraphe 1, du règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) n° 1774/2002 ⁽³⁾ interdit l'alimentation d'animaux terrestres d'une espèce donnée, autres que les animaux à fourrure, au moyen de protéines animales transformées dérivées de corps ou de parties de corps d'animaux de la même espèce, ainsi que l'alimentation des poissons d'élevage au moyen de protéines animales transformées dérivées de corps ou de parties corporelles de poissons d'élevage de la même espèce.

(3) Le règlement (CE) n° 152/2009 de la Commission du 27 janvier 2009 portant fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux ⁽⁴⁾ définit, dans son annexe VI, les

méthodes d'analyse applicables en matière d'identification des constituants d'origine animale pour le contrôle officiel des aliments pour animaux. La méthode de l'examen microscopique, qui est actuellement la seule méthode validée pour détecter la présence de protéines animales dans les aliments pour animaux, permet de distinguer la présence de constituants dérivés d'animaux terrestres de la présence de constituants dérivés de poissons; toutefois, elle ne permet pas de mesurer avec une exactitude suffisante la quantité de constituants d'origine animale dans les aliments pour animaux et ne devrait donc pas être utilisée à cette fin.

(4) Une nouvelle méthode de détection des constituants d'origine animale fondée sur la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) a été validée par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux. Une étude organisée en collaboration avec les laboratoires nationaux de référence des États membres a démontré que la nouvelle méthode était suffisamment robuste pour être utilisée comme méthode de contrôle officiel dans l'Union. Cette nouvelle méthode permet de détecter la présence de constituants d'origine animale dans les aliments pour animaux et de déterminer l'espèce d'origine de ces constituants. Utilisée conjointement à la méthode de l'examen microscopique ou, s'il y a lieu, en remplacement de celle-ci, cette nouvelle méthode pourrait être très utile pour le contrôle de l'application correcte des interdictions d'alimentation prévues dans les règlements (CE) n° 999/2001 et (CE) n° 1069/2009.

(5) Il y a donc lieu de remplacer l'annexe VI du règlement (CE) n° 152/2009 en conséquence.

(6) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale et n'ont soulevé l'opposition ni du Parlement européen ni du Conseil,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

L'annexe VI du règlement (CE) n° 152/2009 est remplacée par le texte figurant à l'annexe du présent règlement.

⁽¹⁾ JO L 165 du 30.4.2004, p. 1.

⁽²⁾ JO L 147 du 31.5.2001, p. 1.

⁽³⁾ JO L 300 du 14.11.2009, p. 1.

⁽⁴⁾ JO L 54 du 26.2.2009, p. 1.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 16 janvier 2013.

Par la Commission
Le président
José Manuel BARROSO

ANNEXE

«ANNEXE VI

MÉTHODES D'ANALYSE APPLICABLES EN MATIÈRE D'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'ORIGINE ANIMALE POUR LE CONTRÔLE OFFICIEL DES ALIMENTS POUR ANIMAUX

1. OBJET ET CHAMP D'APPLICATION

L'identification des constituants d'origine animale dans les aliments pour animaux doit être effectuée à l'aide de la microscopie optique ou d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), conformément aux dispositions prévues dans la présente annexe.

Ces deux méthodes permettent de détecter la présence de constituants d'origine animale dans les matières premières pour aliments des animaux et dans les aliments composés pour animaux. Toutefois, elles ne permettent pas de calculer la quantité de ces constituants dans les matières premières pour aliments des animaux et dans les aliments composés pour animaux. La limite de détection des deux méthodes est inférieure à 0,1 % (p/p).

L'amplification en chaîne par polymérase permet d'identifier le groupe taxonomique des constituants d'origine animale présents dans les matières premières pour aliments des animaux et dans les aliments composés pour animaux.

Ces méthodes doivent être appliquées pour le contrôle du respect des interdictions prévues à l'article 7, paragraphe 1, et à l'annexe IV du règlement (CE) n° 999/2001, ainsi qu'à l'article 11, paragraphe 1, du règlement (CE) n° 1069/2009.

En fonction du type d'aliment pour animaux soumis aux essais, ces méthodes peuvent être utilisées, suivant un protocole opérationnel unique, individuellement ou conjointement conformément aux procédures opérationnelles normalisées établies par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux (EURL-AP) et publiées sur son site internet ⁽¹⁾.

2. MÉTHODES

2.1. **Microscopie optique**2.1.1. *Principe*

Les constituants d'origine animale susceptibles d'être présents dans les matières premières pour aliments des animaux et dans les aliments composés pour animaux envoyés pour analyse sont identifiés sur la base de caractéristiques typiques et identifiables au microscope telles que les fibres musculaires et autres particules de viande, les cartilages, les os, la corne, les poils, les soies, le sang, les plumes, les coquilles d'œuf, les arêtes et les écailles de poisson.

2.1.2. *Réactifs et appareillage*

2.1.2.1. Réactifs

2.1.2.1.1. Agent de concentration

2.1.2.1.1.1. Tétrachloréthylène (densité relative 1,62)

2.1.2.1.2. Réactif de coloration

2.1.2.1.2.1. Solution de rouge d'alizarine (diluer 2,5 ml d'acide chlorhydrique 1 M dans 100 ml d'eau et ajouter 200 mg de rouge d'alizarine à cette solution)

2.1.2.1.3. Milieux de montage

2.1.2.1.3.1. Lessive de soude et de potasse (NaOH à 2,5 % p/v ou KOH à 2,5 % p/v)

2.1.2.1.3.2. Glycérol (non dilué, viscosité: 1 490 cP)

2.1.2.1.3.3. Norland® *Optical Adhesive* 65 (viscosité: 1 200 cP) ou résine ayant des propriétés équivalentes pour la préparation de lames permanentes

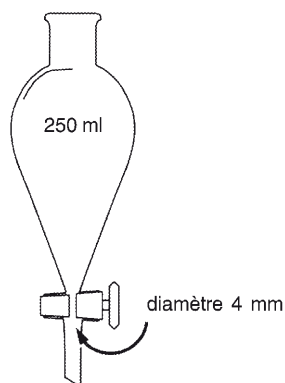
2.1.2.1.4. Milieux de montage avec propriétés de coloration

2.1.2.1.4.1. Solution de lugol (dissoudre 2 g d'iode de potassium dans 100 ml d'eau et ajouter 1 g d'iode en agitant fréquemment)

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2. Réactif cystinique (2 g d'acétate de plomb, 10 g NaOH/100 ml d'eau)
- 2.1.2.1.4.3. Liqueur de Fehling [préparée avant l'utilisation à partir de parts égales (1/1) de deux solutions-mères A et B. Solution A: dissoudre 6,9 g de sulfate de cuivre (II) pentahydraté dans 100 ml d'eau. Solution B: dissoudre 34,6 g de tartrate double de sodium et de potassium tétrahydraté et 12 g de NaOH dans 100 ml d'eau]
- 2.1.2.1.4.4. Tétraméthylbenzidine/Peroxyde d'hydrogène [dissoudre 1 g de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) dans 100 ml d'acide acétique glacial et 150 ml d'eau. Avant l'utilisation, mélanger quatre parts de cette solution de TMB et une part de peroxyde d'hydrogène à 3 %]
- 2.1.2.1.5. Agents de rinçage
- 2.1.2.1.5.1. Éthanol \geq 96 % (qualité technique)
- 2.1.2.1.5.2. Acétone (qualité technique)
- 2.1.2.1.6. Réactif de blanchiment
- 2.1.2.1.6.1. Solution commerciale d'hypochlorite de sodium (9-14 % de chlore actif)
- 2.1.2.2. Appareillage
- 2.1.2.2.1. Balance de précision à 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Équipement de broyage: broyeur ou mortier
- 2.1.2.2.3. Tamis à mailles carrées de 0,25 mm et 1 mm de largeur
- 2.1.2.2.4. Ampoule à décanter conique en verre d'une capacité de 250 ml munie d'un robinet en téflon ou en verre rodé à la base du cône. Le diamètre de l'ouverture du robinet doit être supérieur ou égal à 4 mm. Un bécher de décantation à fond conique peut également être utilisé, à condition que le laboratoire ait démontré que les niveaux de détection sont équivalents à ceux obtenus en utilisant l'ampoule à décanter conique en verre.

Ampoule à décanter



- 2.1.2.2.5. Microscope stéréoscopique couvrant une plage de grossissement final allant de 6,5 à 40 fois au minimum
- 2.1.2.2.6. Microscope composé à fond clair par éclairage à transmission couvrant une plage de grossissement final allant de 100 à 400 fois au minimum. Un microscope en lumière polarisée ou à contraste interférentiel différentiel peut également être utilisé
- 2.1.2.2.7. Verrerie courante de laboratoire
- 2.1.2.2.8. Matériel pour la préparation sur lame: lames de microscope classiques, lames creuses, lamelles (20 × 20 mm), brucelles, spatule fine
- 2.1.3. *Échantillonnage et préparation des échantillons*
- 2.1.3.1. Échantillonnage
- Utiliser un échantillon représentatif prélevé conformément aux dispositions fixées à l'annexe I

2.1.3.2. Précautions à prendre

Afin d'éviter une contamination croisée en laboratoire, tous les équipements recyclables doivent être soigneusement nettoyés avant l'emploi. Les éléments de l'ampoule à décanter doivent être démontés avant le nettoyage. Les éléments de l'ampoule à décanter et la verrerie doivent être prélavés manuellement puis lavés en machine. Les tamis doivent être nettoyés à l'aide d'une brosse à poils synthétiques durs. Un dernier nettoyage des tamis avec de l'acétone et de l'air comprimé est recommandé après le tamisage de matières grasses telles que des farines de poisson.

2.1.3.3. Préparation des échantillons autres que les matières grasses ou les huiles

2.1.3.3.1. Séchage d'échantillons: les échantillons présentant une teneur en humidité supérieure à 14 % doivent être séchés avant le traitement.2.1.3.3.2. Prétamissage des échantillons: il est recommandé de prêtamiser les aliments pour animaux en granulés et les bouchons à l'aide d'un tamis à mailles de 1 mm puis de préparer et d'analyser les deux fractions obtenues comme deux échantillons distincts.2.1.3.3.3. Sous-échantillonnage et broyage: au moins 50 g de l'échantillon doivent être séparés en sous-échantillons destinés à être analysés puis broyés.2.1.3.3.4. Extraction et préparation du résidu: transvaser une portion de 10 g (exactitude de 0,01 g) du sous-échantillon broyé dans l'ampoule à décanter ou le bécher à décantation à fond conique et ajouter 50 ml de tétrachloréthylène. La portion transvasée dans l'ampoule est limitée à 3 g dans le cas des farines de poissons ou d'autres produits d'origine animale purs, d'ingrédients minéraux ou de prémélanges générant plus de 10 % de résidus. Agiter vigoureusement le mélange pendant au moins 30 secondes et ajouter avec précaution au moins 50 ml de tétrachloréthylène en lavant la surface intérieure de l'ampoule pour éliminer les particules adhérentes. Laisser le mélange obtenu se décanter pendant au moins 5 minutes avant de séparer le résidu en ouvrant le robinet.

Si un bécher de décantation à fond conique est utilisé, agiter vigoureusement le mélange pendant au moins 15 secondes et laver soigneusement la surface intérieure avec au moins 10 ml de tétrachloréthylène propre pour éliminer les particules adhérant aux parois du bécher. Laisser le mélange se décanter pendant 3 minutes et agiter à nouveau pendant 15 secondes puis laver soigneusement la surface intérieure avec au moins 10 ml de tétrachloréthylène propre pour éliminer les particules adhérant aux parois du bécher. Laisser le mélange obtenu se décanter pendant au moins 5 minutes puis retirer la fraction liquide, l'éliminer en la laissant soigneusement se décanter et en prenant soin de ne rien perdre du résidu.

Le résidu total doit être séché puis pesé (exactitude de 0,001 g). Si le résidu est constitué de plus de 5 % de particules supérieures à 0,5 mm, il doit être passé à travers un tamis de 0,25 mm, et les deux fractions obtenues doivent être examinées.

2.1.3.3.5. Extraction et préparation des matières flottantes: après la récupération du résidu par la méthode décrite ci-dessus, deux phases devraient rester dans l'ampoule à décanter: une phase liquide constituée de tétrachloréthylène et une phase solide composée de matières flottantes, laquelle est récupérée par le versement complet du tétrachloréthylène hors de l'ampoule en ouvrant le robinet. L'ampoule à décanter doit être retournée, et les matières flottantes doivent être transvasées dans une grande boîte de Pétri et séchées à l'air dans une hotte de laboratoire. Si les matières flottantes sont constituées de plus de 5 % de particules supérieures à 0,5 mm, elles doivent être passées à travers un tamis de 0,25 mm et les deux fractions obtenues doivent être examinées.2.1.3.3.6. Préparation des matières premières: préparer une portion d'au moins 5 g du sous-échantillon broyé. Si la matière est constituée de plus de 5 % de particules supérieures à 0,5 mm, elle doit être passée à travers un tamis de 0,25 mm et les deux fractions obtenues doivent être examinées.

2.1.3.4. Préparation des échantillons constitués de matières grasses ou d'huiles

Le protocole suivant doit être respecté pour la préparation des échantillons constitués de matières grasses ou d'huiles:

- s'il s'agit de graisse solide, chauffer celle-ci dans un four jusqu'à ce qu'elle devienne liquide,
- au moyen d'une pipette, transvaser 40 ml de graisse ou d'huile du fond de l'échantillon dans un tube de centrifugation,
- centrifuger pendant 10 minutes à 4 000 tours/minute,
- si la graisse s'est solidifiée pendant la centrifugation, la réchauffer au four jusqu'à ce qu'elle redevienne liquide,
- centrifuger une nouvelle fois pendant 5 minutes à 4 000 tours/minute,

- à l'aide d'une petite cuillère ou d'une spatule, transvaser une moitié des impuretés obtenues sur des lames microscopiques pour examen; il est recommandé d'utiliser du glycérol comme milieu de montage,
- utiliser les impuretés restantes pour la préparation du résidu, comme décrit au point 2.1.3.3.

2.1.3.5. Utilisation de réactifs de coloration

Pour faciliter l'identification correcte des constituants d'origine animale, l'opérateur peut utiliser des réactifs de coloration au cours de la préparation de l'échantillon, conformément aux orientations formulées par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiées sur son site internet.

Si la solution de rouge d'alizarine est utilisée pour la coloration du résidu, le protocole suivant doit être appliqué:

- transvaser le résidu séché dans une éprouvette en verre et le rincer deux fois avec environ 5 ml d'éthanol (agiter chaque fois au vortex pendant 30 secondes, laisser le solvant se décanter pendant environ 1 minute 30 puis l'éliminer),
- blanchir le résidu avec au moins 1 ml de solution d'hypochlorite de sodium; laisser réagir pendant 10 minutes; remplir l'éprouvette d'eau, laisser le résidu se décanter pendant 2 à 3 minutes puis éliminer doucement l'eau et les particules en suspension,
- rincer deux fois le résidu avec environ 10 ml d'eau (agiter au vortex pendant 30 secondes, laisser se décanter et, chaque fois, éliminer l'eau),
- ajouter 2 à 10 gouttes de solution de rouge d'alizarine et agiter le mélange au vortex; laisser réagir pendant 30 secondes et rincer deux fois le résidu coloré avec environ 5 ml d'éthanol, puis une nouvelle fois avec de l'acétone (agiter chaque fois au vortex pendant 30 secondes, laisser le solvant se décanter environ une minute puis l'éliminer);
- sécher le résidu.

2.1.4. Examen au microscope

2.1.4.1. Préparation des lames

Les lames microscopiques sont préparées à partir du résidu et, selon le choix de l'opérateur, à partir des matières flottantes ou de la matière première. Si un tamisage a été effectué au cours de la préparation de l'échantillon, les deux fractions obtenues (la fraction fine et la fraction grossière) doivent être préparées. Les prises d'essai des fractions étalées sur les lames doivent être représentatives de la fraction entière.

Un nombre suffisant de lames doit être préparé afin de garantir la réalisation d'un protocole d'examen complet, tel que prévu au point 2.1.4.2.

Les lames microscopiques doivent être montées avec le milieu de montage adéquat, conformément aux procédures opérationnelles normalisées établies par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiées sur son site internet. Elles sont recouvertes de lamelles.

2.1.4.2. Protocoles d'observation pour la détection de particules animales dans les aliments composés pour animaux et les matières premières pour aliments des animaux

Les lames microscopiques sont observées conformément au protocole d'observation figurant dans le schéma 1 pour les aliments composés pour animaux et les matières premières pour aliments des animaux autres que les farines de poisson pures, ou dans le schéma 2 pour les farines de poisson pures.

Le résidu et, selon le choix de l'opérateur, les matières flottantes ou la matière première, doivent être observés au microscope composé. Les grosses fractions peuvent en outre être examinées au microscope stéréoscopique. Chaque lame doit être observée entièrement à différents grossissements.

Le nombre minimal de lames à observer à chaque étape du protocole d'observation doit être rigoureusement respecté, à moins que la totalité du matériau de la fraction ne permette pas d'atteindre le nombre de lames prévu. Six lames au plus doivent être observées pour chaque détermination.

Afin de déterminer plus facilement la nature et l'origine des particules, l'opérateur peut utiliser des outils d'aide tels que les systèmes d'aide à la décision, les bibliothèques d'images et les échantillons de référence.

Schéma 1

Protocole d'observation pour la détection de particules animales dans les aliments composés pour animaux et les matières premières pour aliments des animaux autres que les farines de poisson

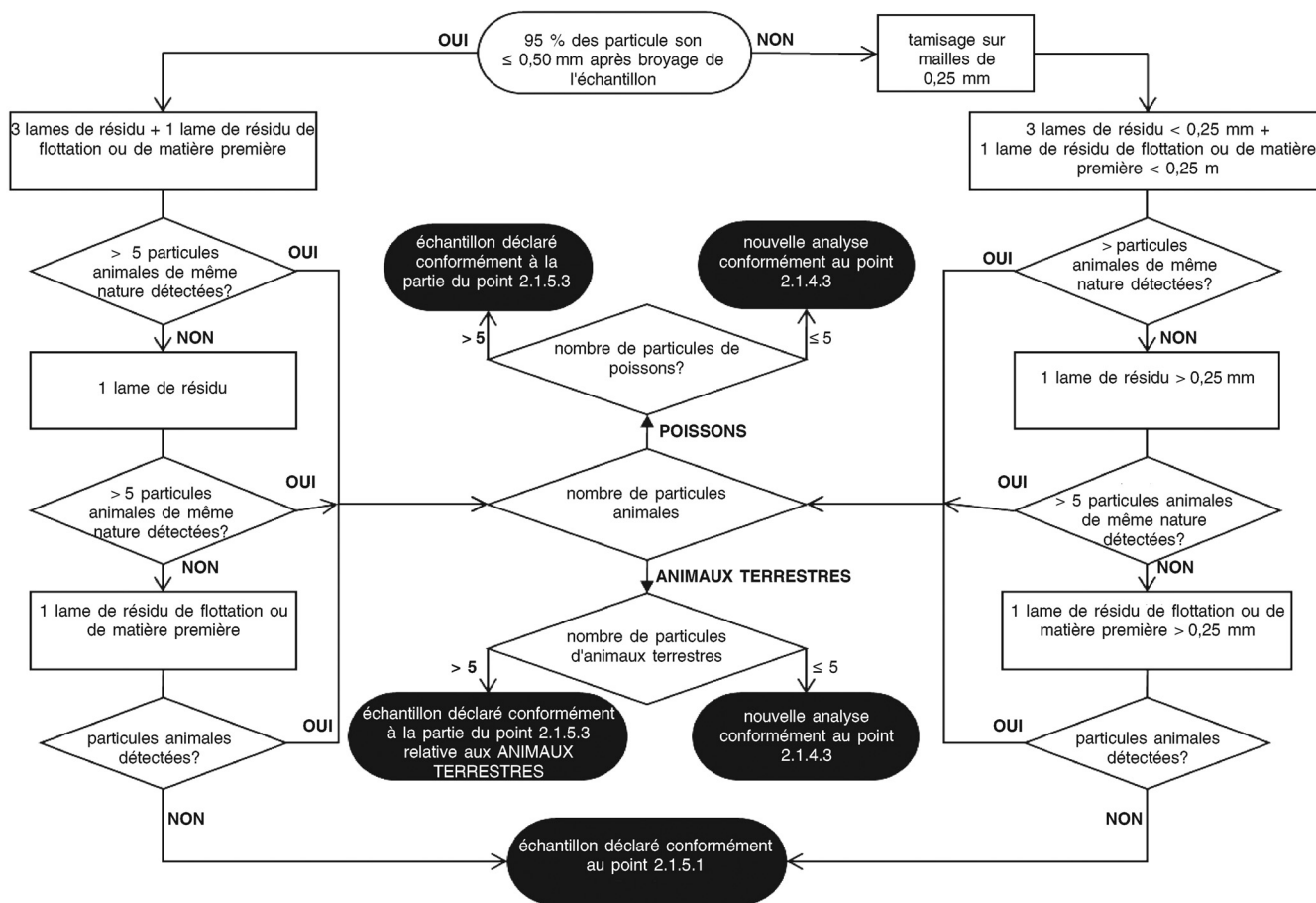
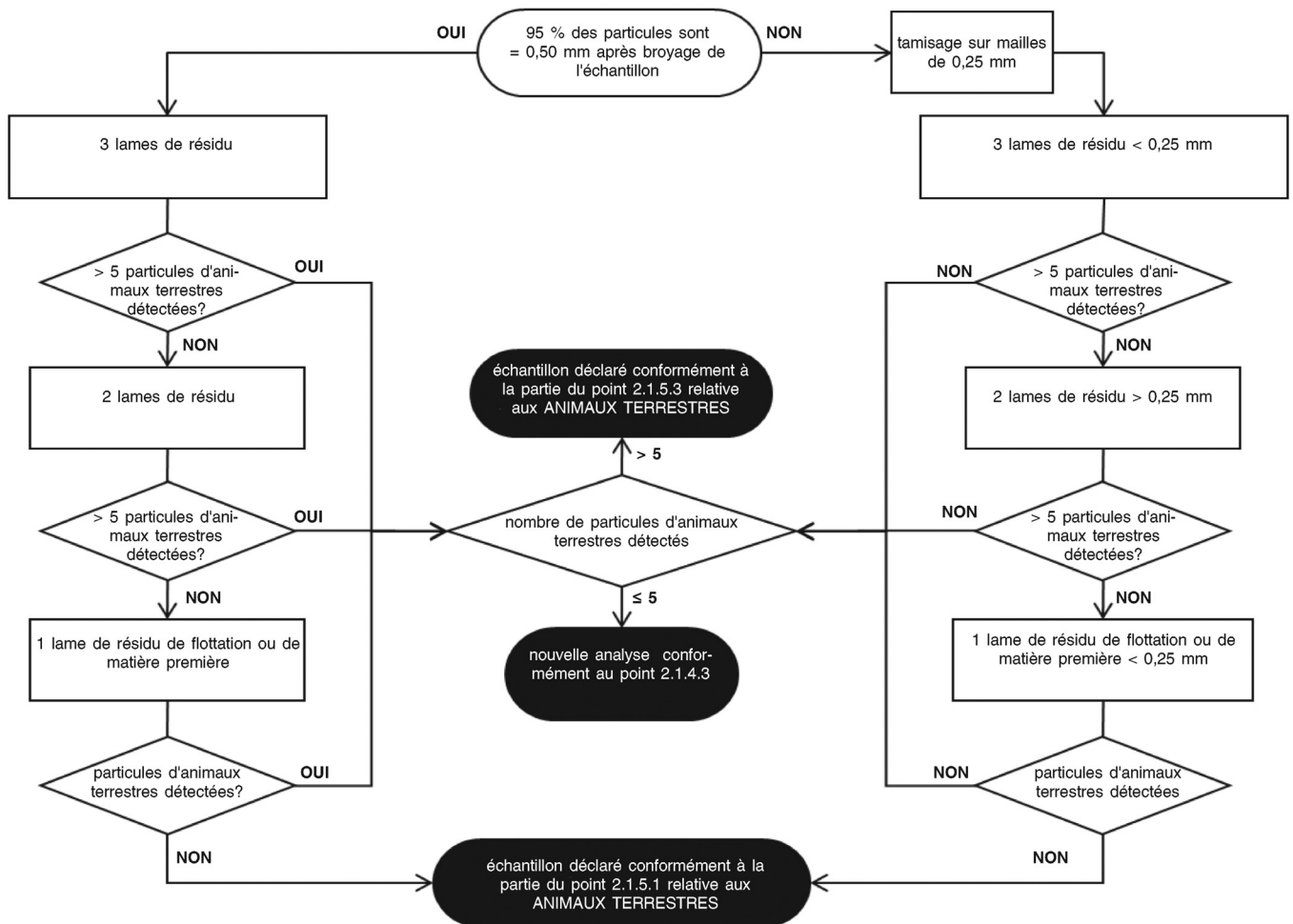


Schéma 2

Protocole d'observation pour la détection de particules animales dans les farines de poisson



2.1.4.3. Nombre de déterminations

Si, à la suite d'une première détermination effectuée conformément au protocole d'observation prévu dans le schéma 1 ou 2, selon le cas, aucune particule animale d'une nature donnée (c'est-à-dire dérivée d'animaux terrestres ou de poissons) n'est détectée, aucune détermination supplémentaire n'est nécessaire, et le résultat de l'analyse doit être rapporté selon les libellés prévus au point 2.1.5.1.

Si, à la suite d'une première détermination effectuée conformément au protocole d'observation prévu dans le schéma 1 ou 2, selon le cas, le nombre total de particules animales d'une nature donnée (c'est-à-dire dérivées d'animaux terrestres ou de poissons) qui sont détectées varie de 1 à 5, une deuxième détermination doit être effectuée à partir d'un nouveau sous-échantillon de 50 g. Si, à la suite de cette deuxième détermination, le nombre de particules animales de cette même nature qui sont détectées varie de 0 à 5, le résultat de l'analyse doit être rapporté selon les libellés prévus au point 2.1.5.2, sinon une troisième détermination doit être effectuée à partir d'un nouveau sous-échantillon de 50 g. Toutefois, si, à la suite des deux premières déterminations, la somme des particules d'une nature donnée qui sont détectées sur l'ensemble des deux déterminations est supérieure à 15, aucune détermination supplémentaire n'est nécessaire et le résultat de l'analyse doit être directement rapporté selon les libellés prévus au point 2.1.5.3. Si, à l'issue de la troisième détermination, la somme des particules animales d'une nature donnée qui sont détectées sur l'ensemble des trois déterminations est supérieure à 15, le résultat de l'analyse doit être rapporté selon les libellés prévus au point 2.1.5.3. Dans tout autre cas, le résultat de l'analyse doit être rapporté selon les libellés prévus au point 2.1.5.2.

Si, à la suite d'une première détermination effectuée conformément au protocole d'observation prévu dans le schéma 1 ou 2, selon le cas, plus de cinq particules animales d'une nature donnée (c'est-à-dire dérivées d'animaux terrestres ou de poissons) sont détectées, le résultat de l'analyse doit être communiqué selon les libellés prévus au point 2.1.5.3.

2.1.5. Expression des résultats

Lorsqu'il rapporte les résultats, le laboratoire doit indiquer le type de matériel sur lequel l'analyse a été conduite (résidu, matières flottantes ou matière première) et le nombre de déterminations effectuées.

Le rapport du laboratoire doit contenir au minimum des informations concernant la présence de constituants dérivés d'animaux terrestres et de poissons.

Les différents cas doivent être présentés de la façon suivante:

2.1.5.1. Aucune particule animale d'une nature donnée n'est détectée:

- l'échantillon soumis à l'analyse ne contient aucune particule dérivée d'un animal terrestre détectable au microscope optique,
- l'échantillon soumis à l'analyse ne contient aucune particule dérivée d'un poisson détectable au microscope optique.

2.1.5.2. Entre une et cinq particules animales d'une nature donnée sont détectées en moyenne:

- l'échantillon soumis à l'analyse ne contient, en moyenne, par détermination, pas plus de cinq particules dérivées d'animaux terrestres détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [de l'os, du cartilage, des muscles, des poils, de la corne, etc.]. Cette faible présence, inférieure à la limite de détection de la méthode de l'examen microscopique, signifie qu'un risque de faux résultat positif ne peut être exclu.

Ou, le cas échéant,

- l'échantillon soumis à l'analyse ne contient, en moyenne, par détermination, pas plus de cinq particules dérivées de poissons détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [de l'os, des écailles, du cartilage, des muscles, des otolithes, des branchies, etc.]. Cette faible présence, inférieure à la limite de détection de la méthode de l'examen microscopique, signifie qu'un risque de faux résultat positif ne peut être exclu.

En cas de prètamisage de l'échantillon de laboratoire, le rapport de laboratoire mentionne la fraction (fraction tamisée, fraction de granules ou de bouchons) dans laquelle les particules animales ont été détectées, dans la mesure où seule la détection de particules animales dans la fraction tamisée peut être le signe d'une contamination de l'environnement.

2.1.5.3. Plus de cinq particules animales d'une nature donnée sont détectées en moyenne:

- l'échantillon soumis à l'analyse contient, en moyenne, par détermination, plus de cinq particules dérivées d'animaux terrestres détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [de l'os, du cartilage, des muscles, des poils, de la corne, etc.].

Ou, le cas échéant,

— l'échantillon soumis à l'analyse contient, en moyenne, par détermination, plus de cinq particules dérivées de poissons détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant ... [de l'os, des écailles, du cartilage, des muscles, des otolithes, des branchies, etc.].

En cas de prétéamaisage de l'échantillon de laboratoire, le rapport de laboratoire mentionne la fraction (fraction tamisée, fraction de granulés ou de bouchons) dans laquelle les particules animales ont été détectées, dans la mesure où seule la détection de particules animales dans la fraction tamisée peut être le signe d'une contamination de l'environnement.

2.2. Amplification en chaîne par polymérase

2.2.1. Principe

Des fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN) d'origine animale susceptibles d'être présents dans les matières premières pour aliments des animaux et les aliments composés pour animaux sont détectés selon une technique d'amplification génique (amplification en chaîne par polymérase, PCR), en ciblant des séquences d'ADN spécifiques par espèce.

L'amplification en chaîne par polymérase nécessite tout d'abord une étape d'extraction de l'ADN. L'extrait d'ADN ainsi obtenu est ensuite soumis à l'étape d'amplification, afin de détecter l'espèce animale visée par l'essai.

2.2.2. Réactifs et appareillage

2.2.2.1. Réactifs

2.2.2.1.1. Réactifs pour l'étape d'extraction de l'ADN

Seuls les réactifs approuvés par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiés sur son site internet doivent être utilisés.

2.2.2.1.2. Réactifs pour l'étape d'amplification génique

2.2.2.1.2.1. Amorces et sondes

Seules les amorces et les sondes présentant des séquences d'oligonucléotides validées par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux doivent être utilisées ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Mélange maître

Seules des solutions de mélanges maîtres ne contenant pas de réactifs susceptibles de fausser les résultats en raison de la présence d'ADN animal doivent être utilisées ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Réactifs de décontamination

2.2.2.1.2.3.1. Solution d'acide chlorhydrique (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Eau de Javel (solution d'hypochlorite de sodium à 0,15 % de chlore actif)

2.2.2.1.2.3.3. Réactifs de décontamination non corrosifs pour des dispositifs coûteux tels que des balances de précision (exemple: DNA Erase™ de MP Biomedicals)

2.2.2.2. Appareillage

2.2.2.2.1. Balance de précision à 0,001 g

2.2.2.2.2. Équipement de broyage

2.2.2.2.3. Thermocycleur permettant la PCR en temps réel

2.2.2.2.4. Microcentrifugeuse pour tubes de microcentrifugation

2.2.2.2.5. Ensemble de micropipettes permettant d'introduire à la pipette de 1 µl à 1 000 µl

2.2.2.2.6. Matériel en plastique standard de biologie moléculaire: tubes de microcentrifugation, embouts à filtres pour micropipettes, microplaques adaptées au thermocycleur.

2.2.2.2.7. Congélateurs pour la conservation des échantillons et des réactifs

⁽¹⁾ La liste des amorces et sondes pour chaque espèce animale ciblée par l'essai est disponible sur le site web du laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux.

⁽²⁾ Des exemples de mélanges maîtres utilisables sont disponibles sur le site web du laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux.

2.2.3. *Échantillonnage et préparation des échantillons*

2.2.3.1. *Échantillonnage*

Utiliser un échantillon représentatif prélevé conformément aux dispositions fixées à l'annexe I.

2.2.3.2. *Préparation de l'échantillon*

Effectuer la préparation d'échantillons de laboratoire précédant l'extraction de l'ADN dans le respect des exigences fixées à l'annexe II. Au moins 50 g de l'échantillon doivent être séparés en sous-échantillons destinés à être analysés puis broyés.

Conformément à la norme ISO 24276, l'échantillon doit être préparé dans une salle différente de celles qui sont utilisées pour l'extraction de l'ADN et les réactions d'amplification génique.

Préparer deux prises d'essai d'au moins 100 mg chacune.

2.2.4. *Extraction de l'ADN*

L'extraction de l'ADN doit être effectuée sur chaque prise d'essai préparée suivant les procédures opérationnelles normalisées établies par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiées sur son site internet.

Conformément à la norme ISO 24276, deux témoins d'extraction doivent être préparés pour chaque série d'extractions:

- un témoin d'extraction à blanc,
- un témoin positif d'extraction de l'ADN.

2.2.5. *Amplification génique*

L'amplification génique doit être effectuée suivant les méthodes validées pour chaque espèce devant être identifiée. Ces méthodes sont fixées dans les procédures opérationnelles normalisées établies par le laboratoire de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiées sur son site internet. Chaque extrait d'ADN doit être analysé au moins à deux dilutions différentes afin d'évaluer l'inhibition.

Conformément à la norme ISO 24276, deux témoins d'amplification doivent être préparés pour chaque espèce cible:

- un témoin positif de l'ADN cible doit être utilisé pour chaque plaque ou série d'épreuves PCR,
- un témoin du réactif d'amplification (également appelé "témoin négatif") doit être utilisé pour chaque plaque ou série d'épreuves PCR.

2.2.6. *Interprétation et expression des résultats*

Lorsqu'il rapporte les résultats, le laboratoire doit indiquer au moins la masse des prises d'essai utilisées, la technique d'extraction utilisée, le nombre de déterminations effectuées et la limite de détection de la méthode.

Les résultats ne doivent pas être interprétés et rapportés si le témoin positif d'extraction de l'ADN et le témoin positif de l'ADN cible ne donnent pas de résultats positifs pour la cible faisant l'objet des essais alors que le témoin du réactif d'amplification est négatif.

Si les résultats des deux prises d'essai ne sont pas cohérents, renouveler au moins la phase d'amplification génique. Si le laboratoire soupçonne que les extraits d'ADN peuvent être la cause de l'incohérence des résultats, une nouvelle extraction d'ADN suivie d'une amplification génique doit être effectuée avant l'interprétation des résultats.

L'expression définitive des résultats repose sur l'intégration et l'interprétation des résultats des deux prises d'essai, conformément aux procédures opérationnelles normalisées établies par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiées sur son site internet.

2.2.6.1. *Résultat négatif*

Un résultat négatif est rapporté comme suit:

Aucun ADN de X n'a été détecté dans l'échantillon soumis à l'analyse (X étant l'espèce animale ou le groupe d'espèces animales visé par l'essai).

2.2.6.2. *Résultats positifs*

Un résultat positif est rapporté comme suit:

De l'ADN de X a été détecté dans l'échantillon soumis à l'analyse (X étant l'espèce animale ou le groupe d'espèces animales visé par l'essai).»