

## REGOLAMENTO (CE) N. 765/2002 DELLA COMMISSIONE

del 3 maggio 2002

**relativo al prelievo di campioni e all'approvazione di determinate modalità per il controllo fisico dei pezzi disossati di carni bovine che fruiscono di una restituzione all'esportazione**

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CE) n. 1254/1999 del Consiglio, del 17 maggio 1999, relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore delle carni bovine<sup>(1)</sup>, modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 2345/2001 della Commissione<sup>(2)</sup>, in particolare l'articolo 33, paragrafo 12,

visto il regolamento (CEE) n. 386/90 del Consiglio, del 12 febbraio 1990, relativo al controllo al momento dell'esportazione di prodotti agricoli che beneficiano di una restituzione o di altri importi<sup>(3)</sup>, modificato dal regolamento (CE) n. 163/94<sup>(4)</sup>, in particolare l'articolo 6,

considerando quanto segue:

(1) A norma dell'articolo 33 del regolamento (CE) n. 1254/1999, per le esportazioni dei prodotti ivi elencati all'articolo 1 la differenza tra i prezzi del mercato mondiale e quelli praticati nella Comunità può essere coperta da una restituzione all'esportazione. Per i prodotti agricoli le modalità di tale regime sono state adottate col regolamento (CE) n. 800/1999 della Commissione, del 15 aprile 1999, recante modalità comuni di applicazione del regime delle restituzioni all'esportazione per i prodotti agricoli<sup>(5)</sup>, modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 2299/2001<sup>(6)</sup>.

(2) Nel settore 5 dell'allegato I del regolamento (CEE) n. 3846/87 della Commissione, del 17 dicembre 1987, che stabilisce la nomenclatura dei prodotti agricoli per le restituzioni all'esportazione<sup>(7)</sup>, modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 488/2002<sup>(8)</sup>, è prevista, in particolare, la concessione di una restituzione per taluni pezzi disossati, a condizione che contengano un tenore minimo di carne bovina magra e, per i pezzi provenienti da bovini maschi adulti, a condizione che siano imballati individualmente.

(3) Il regolamento (CE) n. 2221/95 della Commissione<sup>(9)</sup>, modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 2655/1999<sup>(10)</sup>, stabilisce le modalità relative al controllo fisico al momento dell'esportazione di prodotti agricoli che

beneficiano di una restituzione. Il regolamento (CE) n. 2457/97 della Commissione, del 10 dicembre 1997, relativo al prelievo di campioni nel quadro di un controllo fisico dei pezzi disossati di carni bovine che fruiscono di una restituzione all'esportazione<sup>(11)</sup> ha stabilito alcune condizioni specifiche per le carni bovine.

(4) Per quanto riguarda i pezzi disossati, è opportuno disporre il controllo della provenienza da bovini maschi adulti e, per ragioni di uniformità, stabilire la metodologia da seguire per tali controlli, nonché fissare sanzioni idonee in caso di mancata osservanza della condizione relativa alla provenienza. Per tener conto delle modifiche della nomenclatura applicabile alle restituzioni all'esportazione dei prodotti agricoli prevista dal regolamento (CEE) n. 3846/87, quale modificato dal regolamento (CE) n. 2556/2001<sup>(12)</sup>, è altresì opportuno aggiornare il regolamento (CE) n. 2457/97.

(5) Per ragioni di chiarezza è quindi necessario abrogare e sostituire il regolamento (CE) n. 2457/97.

(6) Le misure previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per le carni bovine,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

*Articolo 1*

1. Il presente regolamento si applica per i controlli fisici attinenti alla natura e alle caratteristiche del prodotto, ai sensi dell'articolo 2, lettera a), del regolamento (CEE) n. 386/90, concernenti:

a) l'obbligo di imballaggio individuale per ciascun pezzo disossato di cui ai codici dei prodotti:

— 0201 30 00 9100,

— 0201 30 00 9120;

b) la provenienza da bovini maschi adulti per i pezzi disossati di cui ai codici dei prodotti:

— 0201 30 00 9100,

— 0201 30 00 9120;

<sup>(1)</sup> GU L 160 del 26.6.1999, pag. 1.<sup>(2)</sup> GU L 315 dell'1.12.2001, pag. 29.<sup>(3)</sup> GU L 42 del 16.2.1990, pag. 6.<sup>(4)</sup> GU L 24 del 29.1.1994, pag. 2.<sup>(5)</sup> GU L 102 del 17.4.1999, pag. 11.<sup>(6)</sup> GU L 308 del 27.11.2001, pag. 19.<sup>(7)</sup> GU L 366 del 24.12.1987, pag. 1.<sup>(8)</sup> GU L 76 del 19.3.2002, pag. 11.<sup>(9)</sup> GU L 224 del 21.9.1995, pag. 13.<sup>(10)</sup> GU L 325 del 17.12.1999, pag. 12.<sup>(11)</sup> GU L 340 dell'11.12.1997, pag. 29.<sup>(12)</sup> GU L 348 del 31.12.2001, pag. 1.

c) il rispetto del tenore medio minimo di carne magra per i pezzi disossati di cui ai codici dei prodotti:

- 0201 30 00 9100,
- 0201 30 00 9120,
- 0201 30 00 9060,
- 0202 30 90 9200.

2. La designazione dei prodotti elencati nel paragrafo 1 corrisponde a quella della nomenclatura dei prodotti agricoli per le restituzioni all'esportazione figurante nell'allegato I, settore 5, del regolamento (CEE) n. 3846/87.

#### Articolo 2

1. Il campione su cui va effettuato il controllo fisico è costituito da due scatoloni interi prelevati in due parti diverse del lotto. Il primo scatolone è destinato alle autorità incaricate del controllo, il secondo è posto sotto il controllo delle autorità doganali come campione di riserva.

2. Si considera un lotto il quantitativo di prodotti per il quale è accettata una delle dichiarazioni seguenti:

- a) la dichiarazione di cui all'articolo 5, paragrafo 1, del regolamento (CE) n. 800/1999;
- b) la dichiarazione di cui all'articolo 26, paragrafo 1, del regolamento (CE) n. 800/1999, nell'ipotesi prevista in tale paragrafo, esclusivamente in caso di magazzinaggio.

#### Articolo 3

Per controllare il rispetto delle condizioni previste all'articolo 1, paragrafo 1, lettera a), le autorità doganali verificano che ogni pezzo del primo scatolone del campione di cui all'articolo 2 sia imballato individualmente e che ciascun imballaggio contenga un solo pezzo. In caso contrario si effettuano le stesse verifiche sul secondo scatolone.

Qualora nei due scatoloni si constati la presenza di un solo pezzo non imballato individualmente o di un solo imballaggio che contiene più di un pezzo, il lotto non è considerato irregolare sempre che siano osservate tutte le altre disposizioni relative alla concessione della restituzione. In caso contrario si constata un'irregolarità.

Qualora si constati un'irregolarità, la restituzione è calcolata sul peso del lotto rettificato. Il peso rettificato si ottiene detraendo dal peso netto dichiarato una percentuale che esprime il peso dei pezzi non conformi rispetto al peso netto totale del campione.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 3 maggio 2002.

#### Articolo 4

Ai fini del controllo del rispetto della condizione relativa alla provenienza, di cui all'articolo 1, paragrafo 1, lettera b), il campione di analisi è costituito da uno o due pezzi prelevati in maniera aleatoria nel primo scatolone del campione di cui all'articolo 2. Se l'analisi evidenzia la presenza di carne diversa da carne bovina proveniente da bovini maschi adulti, per il lotto in esame non viene concessa alcuna restituzione.

Il controllo è effettuato seguendo la metodologia descritta nell'allegato.

Fatti salvi ulteriori controlli eventualmente decisi in caso di presunzione di irregolarità, il controllo è effettuato in modo aleatorio per l'insieme delle operazioni di esportazione e su almeno un terzo delle operazioni selezionate ai fini del controllo fisico.

#### Articolo 5

Per controllare il rispetto delle condizioni di cui all'articolo 1, paragrafo 1, lettera c), si procede alla triturazione di tutto il contenuto del primo scatolone del campione di cui all'articolo 2 in modo da ottenere un campione omogeneo. Se il campione non presenta la percentuale prescritta di carne magra, si esamina allo stesso modo il contenuto del secondo scatolone. Se la media dei due scatoloni non corrisponde al tenore medio di carne magra prescritto, non viene concessa alcuna restituzione per l'intero lotto.

#### Articolo 6

A norma dell'articolo 68 del regolamento (CEE) n. 2913/92 del Consiglio <sup>(1)</sup>, fatto salvo l'articolo 78 dello stesso regolamento, i prelievi e i controlli previsti dal presente regolamento si effettuano al momento della verifica delle dichiarazioni di cui all'articolo 2, paragrafo 2, del presente regolamento, le quali siano state accettate.

#### Articolo 7

Il regolamento (CE) n. 2457/97 è abrogato.

#### Articolo 8

Il presente regolamento entra in vigore il 1° luglio 2002.

Esso si applica alle operazioni per le quali sia accettata una delle dichiarazioni di cui all'articolo 2, paragrafo 2, a partire dal 1° luglio 2002.

Per la Commissione

Franz FISCHLER

Membro della Commissione

<sup>(1)</sup> GU L 302 del 19.10.1992, pag. 1.

## ALLEGATO

**CONTROLLO ANALITICO DELLA PROVENIENZA DA BOVINI ADULTI MASCHI DI TALUNI PEZZI DI CARNE DISSOTTATI****Metodologia da applicare per la determinazione del sesso di provenienza delle carni bovine**

La metodologia da applicare si basa sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) e comprende il campionamento, l'estrazione del DNA, la reazione a catena della polimerasi e l'elettroforesi su gel.

**1. Campioni e sottocampioni**

Il sottocampione è disseccato da una parte interna del pezzo di carne da analizzare usando un coltello (bisturi o simili) sterile (\*). Questo campione viene quindi tritato in una micromacinatrice o tagliato a pezzetti più piccoli per garantire l'idoneità dell'estrazione.

I campioni devono essere preparati in un luogo di lavoro diverso da quello in cui si procede alla PCR. I materiali devono essere manipolati in un ambiente facile da pulire, utilizzando preferibilmente un banco pulito in modo da evitare qualsiasi contatto con altri campioni.

Per preparare il campione di carne occorre utilizzare lame o bisturi o altri simili strumenti sterili (\*).

**2. Estrazione e purificazione del DNA**

L'estrazione e la purificazione del DNA devono essere effettuate con procedimenti convenzionali (<sup>1</sup>), oppure con kit pronti all'uso (secondo le seguenti fasi: solubilizzazione del campione di carne in tampone di lisi contenente tensioattivi, detergenti e proteasi K, applicazione del campione solubilizzato ad una resina legante del DNA, rimozione delle sostanze diverse dal DNA attraverso ripetuti lavaggi ed eluzione finale del DNA purificato in acqua o tampone iposodico) oppure estrazione del DNA in soluzione di idrossido di sodio (<sup>2</sup>).

Il successo dell'estrazione può essere controllato attraverso l'elettroforesi su gel: questo procedimento è raccomandato, ma non obbligatorio.

Convalida: per ogni lotto di campioni su cui effettuare l'estrazione occorre compiere in parallelo un'estrazione di controllo (ossia senza carne) per dimostrare la validità del procedimento applicato.

**3. Reazione a catena della polimerasi (PCR)**

*Principio:* Il principio della PCR consiste in una procedura in tre fasi (denaturazione, appaiamento dei primer, allungamento) che deve essere ripetuta per 25-40 volte (numero di «cicli» del metodo). I reagenti (tampone, MgCl<sub>2</sub>, deossinucleotidi, primer, polimerasi DNA termostabile, acqua sterilizzata) vengono mescolati tra loro seguendo il metodo stabilito per ottenere la miscela di reazione. Per la preparazione della miscela di reazione devono essere usate pipette apposite. La miscela di reazione è quindi aggiunta al DNA stampo (DNA estratto). La reazione ha luogo in un termociclatore. Alla fine della reazione i prodotti della PCR sono analizzati mediante elettroforesi su gel o conservati alla temperatura di 4 °C o congelati a - 20 °C.

Il metodo raccomandato (<sup>3</sup>) da applicare, con riferimento al filamento stampo, ha lo scopo di amplificare una sequenza all'interno del locus dell'amelogenina (gene omologo) oppure all'interno della regione ZFX/Y (PCR allele-specifica).

I primer specifici per questi due tipi di metodologie sono i seguenti:

Amelogenina diretta: 5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3'

Amelogenina inversa: 5'-CCCGCTTGGTCTGTCTGTTGC-3'

(Ennis, S., and Gallagher, T.F. (1994) Anim.Genet. 25: 425-427)

Amelogenina diretta: 5'-AAATTCTCTCACAGTCCAAG-3'

Amelogenina inversa: 5'-CAACAGGTAATTTTCCTTTAG-3'

(Chen, C.M., Hu, C.L., Wang, C.H., Hung, C.M., Wu, H.K., Choo, K.B., and Cheng, W.T.K. (1999) Mol.Reprod.Dev. 54, 209-214)

ZFX (allele-specifico), diretto: 5'-GACAGCTGAACAAGTGTACTG-3'

ZFX (allele-specifico), inverso: 5'-AATGTCACACTTGAATCGCATC-3'

ZFY (allele-specifico), diretto: 5'-GAAGGCCTTGAATGTGATAAC-3'

ZFY (allele-specifico), inverso: 5'-CTGACAAAAGGTGGCGATTTC-3'

(Kirkpatrick, B.W., and Monson, R.L. (1993) J.Reprod.Fertil. 98: 335-340)

ZFX diretto: 5'-AGCTGAACAAGGGTACTG-3'

ZFX diretto: 5'-AGCTGAACAAGGGTACTG-3'

ZFX/Y inverso: 5'-CCAGTATGGATTTCGATGT-3'

(Zinovieva, N., Palma, G., Müller, M., and Brem G. (1995) Theriogenology 43: 265)

(\*) Non contaminati con DNA.

<sup>(1)</sup> Descritti da: Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (eds) in: Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989).

<sup>(2)</sup> Descritto da: Elphinstone, J.G., Hennessey, J., Wilson, J.K., and Stead, D.E. (1996) Bulletin OEPP/EPP 26, 663-678.

<sup>(3)</sup> Le metodiche PCR diverse da quella qui raccomandata devono essere preventivamente approvate da un laboratorio di riferimento designato dalle autorità.

Le miscele di reazione per la PCR devono essere preparate su un banco pulito, che deve essere disinfettato dopo l'uso con detergenti e raggi ultravioletti.

- *Elaborazione del metodo*: è possibile che sia necessario apportare delle variazioni ai metodi pubblicati, relative per esempio all'esatta composizione della miscela di reazione (concentrazione del  $MgCl_2$ , concentrazione dei primer), alle quantità del DNA stampo da utilizzare, oppure a un adattamento del programma delle temperature (gradi, durata). Qualora si ottengano prodotti dell'amplificazione non specifici, occorrerà ottimizzare il metodo (intervendo ad esempio sulla temperatura di appaiamento, sulla concentrazione del  $MgCl_2$  e dei primer ecc.) in modo da garantire l'esattezza dei risultati.
- *Convalida del metodo*: il metodo da applicare nelle analisi di routine deve essere debitamente convalidato. Per ogni serie di campioni occorre analizzare tutti i controlli seguenti: controllo dell'estrazione (senza carne), controllo PCR negativo e campioni di riferimento (carne di bovini maschi e femmine, ma anche un campione di carne non bovina). Inoltre, in caso di cambiamento di sostanze chiave come la DNA polimerasi (diverso prodotto o diverso fornitore) o i primer (nuova partita), occorre procedere ad una nuova convalida.
- *Buone pratiche di laboratorio*: è assolutamente indispensabile osservare le buone pratiche di laboratorio, come un'adeguata pulizia e disinfezione del posto di lavoro e degli strumenti utilizzati, dosaggio dei primer, uso di pipette speciali ecc.

#### 4. Analisi dei prodotti dell'amplificazione mediante elettroforesi su gel

I frammenti ottenuti con la PCR (ampliconi) devono essere analizzati mediante elettroforesi su gel. Si possono utilizzare soltanto gel di agarosio colorati con bromuro di etidio oppure gel di poliacrilammide argentati dopo il termine della separazione elettroforetica. Occorre usare un idoneo marcatore del peso molecolare sul gel per determinare la dimensione approssimativa dei prodotti ottenuti dall'amplificazione.

#### 5. Documentazione

I risultati ottenuti devono essere adeguatamente documentati (immagini del gel, descrizione dei risultati, annotazione di eventuali risultati inaspettati).

---