

KOMISIJAS REGULA (ES) Nr. 51/2013**(2013. gada 16. janvāris),****ar ko groza Regulu (EK) Nr. 152/2009 attiecībā uz analīzes metodēm, lai noteiktu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļas barības oficiālajai kontrolei****(Dokuments attiecas uz EEZ)**

EIROPAS KOMISIJA,

ņemot vērā Līgumu par Eiropas Savienības darbību,

ņemot vērā Eiropas Parlamenta un Padomes 2004. gada 29. aprīļa Regulu (EK) Nr. 882/2004 par oficiālo kontroli, ko veic, lai nodrošinātu atbilstības pārbaudi saistībā ar dzīvnieku barības un pārtikas aprites tiesību aktiem un dzīvnieku veselības un dzīvnieku labturības noteikumiem⁽¹⁾, un jo īpaši tās 11. panta 4. punktu,

tā kā:

- (1) Eiropas Parlamenta un Padomes 2001. gada 22. maija Regulas (EK) Nr. 999/2001, ar ko paredz noteikumus par dažu transmisīvo sūkļveida encefalopātiju profilaksi, kontroli un izskaušanu⁽²⁾, 7. panta 1. punktā paredzēts, ka atgremotājus ir aizliegts barot ar proteīniem, kas iegūti no dzīvniekiem. Šo aizliegumu saskaņā ar minētās regulas IV pielikumu attiecina arī uz dzīvniekiem, kas nav atgremotāji, un ierobežo attiecībā uz šo dzīvnieku barošanu ar dzīvnieku izcelsmes produktiem.
- (2) Eiropas Parlamenta un Padomes 2009. gada 21. oktobra Regulas (EK) Nr. 1069/2009, ar ko nosaka veselības aizsardzības noteikumus attiecībā uz dzīvnieku izcelsmes blakusproduktiem un atvasinātajiem produktiem, kuri nav paredzēti cilvēku patēriņam, un ar ko atceļ Regulu (EK) Nr. 1774/2002⁽³⁾, 11. panta 1. punktā aizliegta kādas sauszemes dzīvnieku sugas (izņemot kažokzvēru) barošana ar pārstrādātām dzīvnieku olbaltumvielām, kas atvasinātas no tās pašas sugas dzīvnieku ķermeņiem vai ķermeņa daļām, kā arī zivjraudzētavās audzētu zivju barošana ar pārstrādātām dzīvnieku olbaltumvielām, kas atvasinātas no tās pašas sugas zivjraudzētavās audzētu zivju ķermeņiem vai ķermeņa daļām.

- (3) Komisijas 2009. gada 27. janvāra Regulas (EK) Nr. 152/2009, ar ko nosaka paraugu ņemšanas un analīzes

metodes barības oficiālajai kontrolei⁽⁴⁾, VI pielikumā izklāstītas analīzes metodes, lai noteiktu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļas barības oficiālajai kontrolei. Mikroskopiskā metode, kas pašlaik ir vienīgā apstiprinātā metode, lai noteiktu dzīvnieku izcelsmes proteīnu klātbūtni barībā, ļauj konstatēt, vai klātesošās sastāvdaļas ir radušās no sauszemes dzīvniekiem vai no zivīm, taču ar to nevar pietiekami precīzi noteikt barībā esošo dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu daudzumu, un tādēļ šo metodi nevajadzētu izmantot šādā nolūkā.

- (4) ES references laboratorija attiecībā uz dzīvnieku proteīniem barībā apstiprināja jaunu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu noteikšanas metodi, kas balstīta uz polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR). Ar dalībvalstu valsts references laboratorijām rīkots īstenojamības pētījums pierādīja, ka jaunā metode ir pietiekami uzticama, lai to izmantotu kā oficiālās kontroles metodi Savienībā. Šī jaunā metode ļauj noteikt dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu klātbūtni barībā, kā arī identificēt šo sastāvdaļu izcelsmes sugu. Regulās (EK) Nr. 999/2001 un (EK) Nr. 1069/2009 noteikto barošanas aizliegumu pareizas īstenošanas kontrolei būtu ļoti vērtīgi, ja ar šo jauno metodi papildinātu vai vajadzības gadījumā, aizstātu mikroskopisko metodi.
- (5) Tāpēc attiecīgi būtu jāaizstāj Regulas (EK) Nr. 152/2009 VI pielikums.
- (6) Šajā regulā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Pārtikas aprites un dzīvnieku veselības pastāvīgās komitejas atzinumu, un ne Eiropas Parlaments, ne Padome pret tiem nav iebilduši,

IR PIENĒMUSI ŠO REGULU.

1. pants

Regulas (EK) Nr. 152/2009 VI pielikumu aizstāj ar šīs regulas pielikuma tekstu.

⁽¹⁾ OV L 165, 30.4.2004., 1. lpp.⁽²⁾ OV L 147, 31.5.2001., 1. lpp.⁽³⁾ OV L 300, 14.11.2009., 1. lpp.⁽⁴⁾ OV L 54, 26.2.2009., 1. lpp.

2. pants

Šī regula stājas spēkā divdesmitajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī*.

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

Briselē, 2013. gada 16. janvārī

Komisijas vārdā –
priekšsēdētājs
José Manuel BARROSO

PIELIKUMS

"VI PIELIKUMS

ANALĪZES METODES, LAI NOTEIKTU DZĪVNIĒKU IZCELSMES SASTĀVDAĻAS BARĪBAS OFICIĀLAI KONTROLEI

1. MĒRĶIS UN DARBĪBAS JOMA

Lai barībā noteiktu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļas, saskaņā ar pielikumā izklāstītajiem noteikumiem izmanto gaismas mikroskopiju vai polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR).

Šīs divas metodes ļauj noteikt dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu klātbūtni barības sastāvdaļās un barības maisījumos. Tomēr ar tām nevar aprēķināt minēto sastāvdaļu daudzumu barības sastāvdaļās un barības maisījumos. Abām metodēm noteikšanas robeža ir mazāka par 0,1 % (m/m).

PĶR metode ļauj noteikt barības sastāvdaļās un barības maisījumos klātesošo dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu taksonomisko grupu.

Minētās metodes izmanto Regulas (EK) Nr. 999/2001 7. panta 1. punktā un IV pielikumā un Regulas (EK) Nr. 1069/2009 11. panta 1. punktā noteikto aizliegumu piemērošanas kontrolei.

Atkarībā no testējamās barības veida minētās metodes atsevišķi vai kopā var izmantot viena operatīvā protokola ietvaros atbilstīgi standarta darbības procedūrām (SOP), ko izveidojusi un savā tīmekļa vietnē ⁽¹⁾ publicējusi ES references laboratorija attiecībā uz dzīvnieku proteīniem barībā (EURL-AP).

2. METODES

2.1. **Gaismas mikroskopija**2.1.1. *Principi*

Dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļas, kuras var būt analīzei nosūtītajās barības sastāvdaļās un barības maisījumos, identificē, pamatojoties uz raksturīgiem un ar mikroskopu nosakāmiem elementiem, piemēram, muskuļu šķiedrām un citām gaļas daļiņām, skrimšļiem, kauliem, ragiem, matiem, sariem, asinīm, spalvām, olu čaumalām, asakām un zvīņām.

2.1.2. *Reāģenti un aprīkojums*

2.1.2.1. Reāģenti

2.1.2.1.1. Koncentrēšanas aģents

2.1.2.1.1.1. Tetrahloretilēns (relatīvais blīvums 1,62)

2.1.2.1.2. Krāsošanas reāģents

2.1.2.1.2.1. Alizarīnsarkanais šķīdums (atšķaida 2,5 ml 1M sāļsskābes 100 mililitros ūdens un pievieno šim šķīdumam 200 mg alizarīnsarkanā)

2.1.2.1.3. Ietvarvide

2.1.2.1.3.1. Sārms (NaOH 2,5 % (m/V) vai KOH 2,5 % (m/V))

2.1.2.1.3.2. Glicerīns (neatšķaidīts, viskozitāte: 1 490 cP)

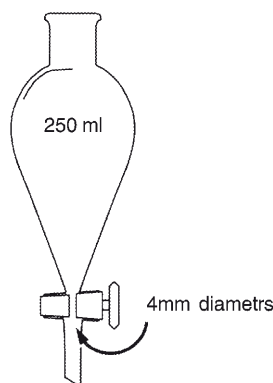
2.1.2.1.3.3. *Norland*® *Optical Adhesive 65* (viskozitāte: 1 200 cP) vai sveķi ar identiskām īpašībām pastāvīga priekšmetstikliņa sagatavošanai

2.1.2.1.4. Krāsojoša ietvarvide

2.1.2.1.4.1. Lugola šķīdums (izšķīdina 2 g kālija jodīda 100 mililitros ūdens un pievieno 1 g joda, bieži sakratot)

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>.

- 2.1.2.1.4.2. Cistīna reaģents (2 g svina acetāta, 10 g NaOH/100 ml ūdens)
- 2.1.2.1.4.3. Fēlinga reaģents (pirms lietošanas sagatavo no divu izejas standartšķīdumu A un B vienādām daļām (1/1). A šķīdums: 6,9 g vara (II) sulfāta pentahidrāta izšķīdina 100 ml ūdens. B šķīdums: 34,6 g kālija nātrija tartrāta tetrahidrāta un 12 g NaOH izšķīdina 100 ml ūdens)
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidīna/ūdeņraža peroksīds (1 g 3,3',5,5' tetrametilbenzidīna (TMB) izšķīdina 100 ml ledus etiķskābes un 150 ml ūdens. Pirms izmantošanas 4 daļas šā TMB šķīduma sajauc ar 1 daļu 3 % ūdeņraža peroksīda)
- 2.1.2.1.5. Skalošanas aģenti
- 2.1.2.1.5.1. Etanols $\geq 96\%$ (tehniskais)
- 2.1.2.1.5.2. Acetons (tehniskais)
- 2.1.2.1.6. Balināšanas reaģents
- 2.1.2.1.6.1. Komerciāls nātrija hipohlorīta šķīdums (9–14 % aktīvā hlora)
- 2.1.2.2. Aprīkojums
- 2.1.2.2.1. Analītiskie svāri ar precizitāti līdz 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Smalcināšanas ierīce: dzirnaviņas vai piesta
- 2.1.2.2.3. Sieti ar 0,25 mm un 1 mm platām kvadrātveida acīm
- 2.1.2.2.4. Konusveida dalāmpiltuve ar 250 ml tilpumu, aprīkota ar teflona vai slīpēta stikla krānu konusa pamatnē. Krāna atvēruma diametrs ir ≥ 4 mm. Var arī izmantot izgulsnēšanas vārglāzi ar konisku dibenu, ja laboratorija ir pierādījusi, ka noteikšanas robežas ir identiskas tām, ko iegūst, izmantojot konusveida dalāmpiltuvi.

Dalāmpiltuve

- 2.1.2.2.5. Stereomikroskops ar kopējā palielinājuma amplitūdu vismaz no 6,5 \times līdz 40 \times
- 2.1.2.2.6. Saliktais mikroskops ar kopējā palielinājuma amplitūdu vismaz no 100 \times līdz 400 \times un atstarotas gaismas gaišo lauku. Papildus var izmantot polarizēto gaismu un diferenciālās interferences kontrastu
- 2.1.2.2.7. Laboratorijas standarta stikla trauki
- 2.1.2.2.8. Aprīkojums priekšmetstikliņu sagatavošanai: parasti mikroskopa priekšmetstikliņi, priekšmetstikliņi ar iedobi, segstikliņi (20 \times 20 mm), pincete, smalka lāpstiņa
- 2.1.3. *Paraugu ņemšana un paraugu sagatavošana*
- 2.1.3.1. Paraugu ņemšana
- Izmanto raksturīgu paraugu, kas ņemts saskaņā ar I pielikumā izklāstītajiem noteikumiem.

- 2.1.3.2. Piesardzības pasākumi
- Lai laboratorijā novērstu savstarpēju piesārņošanu, visu vairākkārt izmantojamo aprīkojumu pirms izmantošanas rūpīgi notīra. Dalāmpiltuvi pirms tīrīšanas sadala pa daļām. Dalāmpiltuves daļas un stikla traukus no sākuma mazgā ar rokām un tad mazgāšanas ierīcē. Sietus tīra, izmantojot suku ar cietiem, sintētiskiem sariem. Ja sijāti taukaini līdzekļi, piemēram, zivju milti, sietu galīgo tīrīšanu ieteicams veikt ar acetonu un saspiestu gaisu.
- 2.1.3.3. Tādu paraugu sagatavošana, kas nav tauku vai eļļas paraugi
- 2.1.3.3.1. Paraugu žāvēšana: paraugus, kuru mitruma saturs ir > 14 %, pirms izmantošanas žāvē.
- 2.1.3.3.2. Paraugu priekšsijāšana: granulētu barību un kodolus ieteicams priekšsijāt līdz 1 mm izmēram un tad iegūtās divas frakcijas sagatavot un analizēt kā atsevišķus paraugus.
- 2.1.3.3.3. Pakārtotu paraugu ņemšana un smalcināšana: vismaz 50 g parauga ņem pakārtota parauga analīzei un tad sasmalcina.
- 2.1.3.3.4. Nogulšņu ekstrakcija un sagatavošana: 10 g (ar precizitāti līdz 0,01 g) smalcināta pakārtotā parauga pārnes dalāmpiltuvē vai izgulsnēšanas vārglāzē ar konisku dibenu un pievieno 50 ml tetrahloretilēna. Attiecībā uz zivju miltiem vai citiem tīriem dzīvnieku izcelsmes produktiem, minerālu sastāvdaļām vai premiksiem, kas rada vairāk nekā 10 % nogulšņu, piltuvē pārnesto daudzumu samazina līdz 3 g. Maisījumu vismaz 30 sekundes spēcīgi krata un uzmanīgi pievieno vēl vismaz 50 ml tetrahloretilēna, noskalojot piltuves iekšējo virsmu, lai atdalītu jebkādas pielipušas daļiņas. Iegūto maisījumu nostādina vismaz piecas minūtes pirms atver krānu nogulšņu atdalīšanai.
- Ja izmanto izgulsnēšanas vārglāzi ar konisku dibenu, maisījumu spēcīgi maisa vismaz 15 sekundes un jebkādas daļiņas, kas pielipušas vārglāzes malām, uzmanīgi noskalo no iekšējās virsmas ar vismaz 10 ml tīra tetrahloretilēna. Maisījumu nostādina trīs minūtes un tad atkal maisa 15 sekundes, un jebkādas vārglāzes malīnām pielipušas daļiņas uzmanīgi noskalo no iekšējās virsmas ar vismaz 10 ml tetrahloretilēna. Maisījumu nostādina vismaz piecas minūtes un tad, uzmanīgi dekantējot, šķidro frakciju atdala un atmet, cenšoties saglabāt visas nogulsnes.
- Nogulsnes izžāvē un pēc tam nosver (ar precizitāti līdz 0,001 g). Ja vairāk nekā 5 % nogulšņu sastāv no daļiņām, kas > 0,50 mm, tās sijā līdz 0,25 mm lielumam, un pārbauda divas iegūtās frakcijas.
- 2.1.3.3.5. Flotātu ekstrakcija un sagatavošana: pēc tam, kad ar iepriekš aprakstīto metodi atgūtas nogulsnes, dalāmpiltuvē būtu jāpaliek divām fāzēm: no tetrahloretilēna sastāvošai šķidrai fāzei un no flotējoša materiāla sastāvošai cietai fāzei. Cietā fāze ir flotāts, ko atgūst, ja no piltuves, atverot krānu, pilnībā nolej tetrahloretilēnu. Apgriežot dalāmpiltuvi, flotātu pārnes Petri trauciņā un ar gaisu žāvē velkmes skapī. Ja vairāk nekā 5 % flotāta sastāv no daļiņām, kas > 0,50 mm, to sijā līdz 0,25 mm lielumam, un pārbauda divas iegūtās frakcijas.
- 2.1.3.3.6. Izejvielu sagatavošana: sagatavo vismaz 5 g samalta pakārtotā parauga. Ja vairāk nekā 5 % materiāla sastāv no daļiņām, kas > 0,50 mm, to sijā līdz 0,25 mm lielumam, un pārbauda divas iegūtās frakcijas.
- 2.1.3.4. Tauku vai eļļas paraugu sagatavošana
- Šo protokolu izmanto, sagatavojot tauku vai eļļas paraugus:
- ja tauki ir cieti, tos sasilda krāsnī, līdz tie kļūst šķidri,
 - izmantojot pipeti, 40 ml tauku vai eļļas no parauga apakšpuses pārnes uz centrifugēšanas mēģeni,
 - centrifugē 10 minūtes pie 4 000 apgr./min,
 - ja pēc centrifugēšanas tauki ir cieti, tos sasilda krāsnī, līdz tie kļūst šķidri,
 - atkārtoti centrifugē piecas minūtes pie 4 000 apgr./min,

— izmantojot nelielu karoti vai lāpstiņu, pusi no dekantētā piemaisījuma pārbaudīšanai pārnes uz mikroskopa priekšmetstikliņiem (kā ietvarvidi ieteicams izmantot glicerīnu),

— atlikušos piemaisījumus izmanto nogulšņu sagatavošanā, kā aprakstīts 2.1.3.3. punktā.

2.1.3.5. Krāsošanas reaģentu izmantošana

Lai atvieglotu dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu noteikšanu, uzņēmēji paraugu sagatavošanas laikā var izmantot reaģentus saskaņā ar pamatnostādņēm, ko *EURL-AP* izstrādājusi un publicējusi savā tīmekļa vietnē.

Ja nogulsnes krāsotas ar alizarīnsarkano šķīdumu, piemēro šādu protokolu:

— izžāvētās nogulsnes pārnes stikla mēģenē un divreiz noskalo ar apmēram 5 ml etanola (katru reizi virpuļmikseri izmanto 30 sekundes, šķīdinātāju nostādina apmēram pusotras minūtes un nolej),

— nogulsnes balina, pievienojot vismaz 1 ml nātrija hipohlorīta šķīduma. Reakcijai ļauj turpināties 10 minūtes. Mēģeni piepilda ar ūdeni, nogulsnes nostādina 2–3 minūtes un lēni nolej ūdeni un suspendētās daļiņas,

— nogulsnes noskalo vēl divas reizes ar apmēram 10 ml ūdens (katru reizi virpuļmikseri izmanto 30 sekundes, ļauj nogulsnēties un nolej ūdeni),

— pievieno 2–10 pilienus alizarīnsarkanā šķīduma un maisījumu ievieto virpuļmikserī. Reakcijai ļauj notikt 30 sekundes un iekrāsotās nogulsnes divreiz noskalo ar apmēram 5 ml etanola un tad vienreiz ar acetonu (katru reizi virpuļmikseri izmanto 30 sekundes, šķīdumu nostādina apmēram 1 minūti un nolej),

— iekrāsotās nogulsnes žāvē.

2.1.4. Mikroskopiskā pārbaude

2.1.4.1. Priekšmetstikliņa sagatavošana

Mikroskopa priekšmetstikliņus sagatavo no nogulsnēm un, atkarībā no uzņēmēja izvēles, no flotāta vai izejvielas. Ja paraugu sagatavošanā izmantota sijāšana, sagatavo abas divas iegūtās frakcijas (smalko un rupjo). Uz priekšmetstikliņiem uznesie frakciju paraugi raksturo visu frakciju.

Lai nodrošinātu pilnīgu pārbaudes protokola izpildi, kā noteikts 2.1.4.2. punktā, sagatavo pietiekamu skaitu priekšmetstikliņu.

Saskaņā ar *SOP*, ko izstrādājusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi *EURL-AP*, mikroskopa priekšmetstikliņus pārklāj ar atbilstošu ietvarvidi. Priekšmetstikliņus pārklāj ar segstikliņiem.

2.1.4.2. Novērojumu protokoli dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu noteikšanai barības maisījumos un barības sastāvdaļās

Sagatavotos mikroskopa priekšmetstikliņus novēro saskaņā ar 1. diagrammā (barības maisījumiem un barības līdzekļiem, kas nav tīri zivju milti) un 2. diagrammā (tīriem zivju miltiem) norādītajiem novērošanas protokoliem.

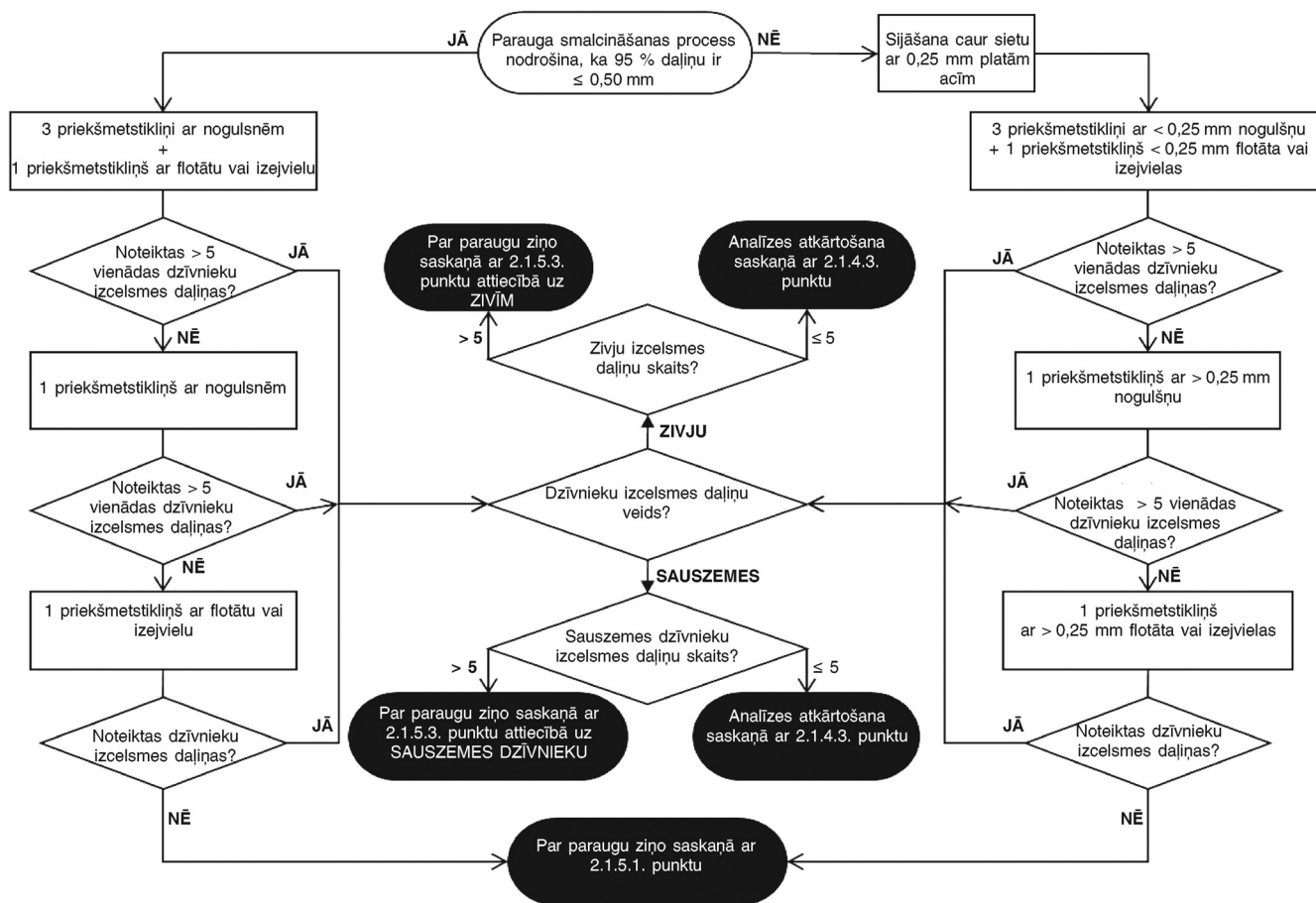
Nogulšņu un, atkarībā no laboranta izvēles, flotātu vai izejvielu mikroskopiskos novērojumus veic, izmantojot salikto mikroskopu. Attiecībā uz rupjajām daļiņām papildus saliktajam mikroskopam var izmantot stereomikroskopu. Katru priekšmetstikliņu pilnībā pārbauda dažādos palielinājumos.

Stingri ievēro katrā novērošanas protokola posmā noteikto minimālo novērojamo priekšmetstikliņu skaitu, izņemot gadījumus, kad frakcijas materiāla kopums ir nepietiekams noteiktā priekšmetstikliņu skaita nodrošināšanai. Katrā noteikšanas reizē novēro ne vairāk kā sešus priekšmetstikliņus.

Lai atvieglotu daļiņu veida un izcelsmes identificēšanu, laborants var izmantot tādas atbalsta instrumentus, kā piemēram, lēmumatbalsta sistēmu, attēlu bibliotēkas un standartparaugus.

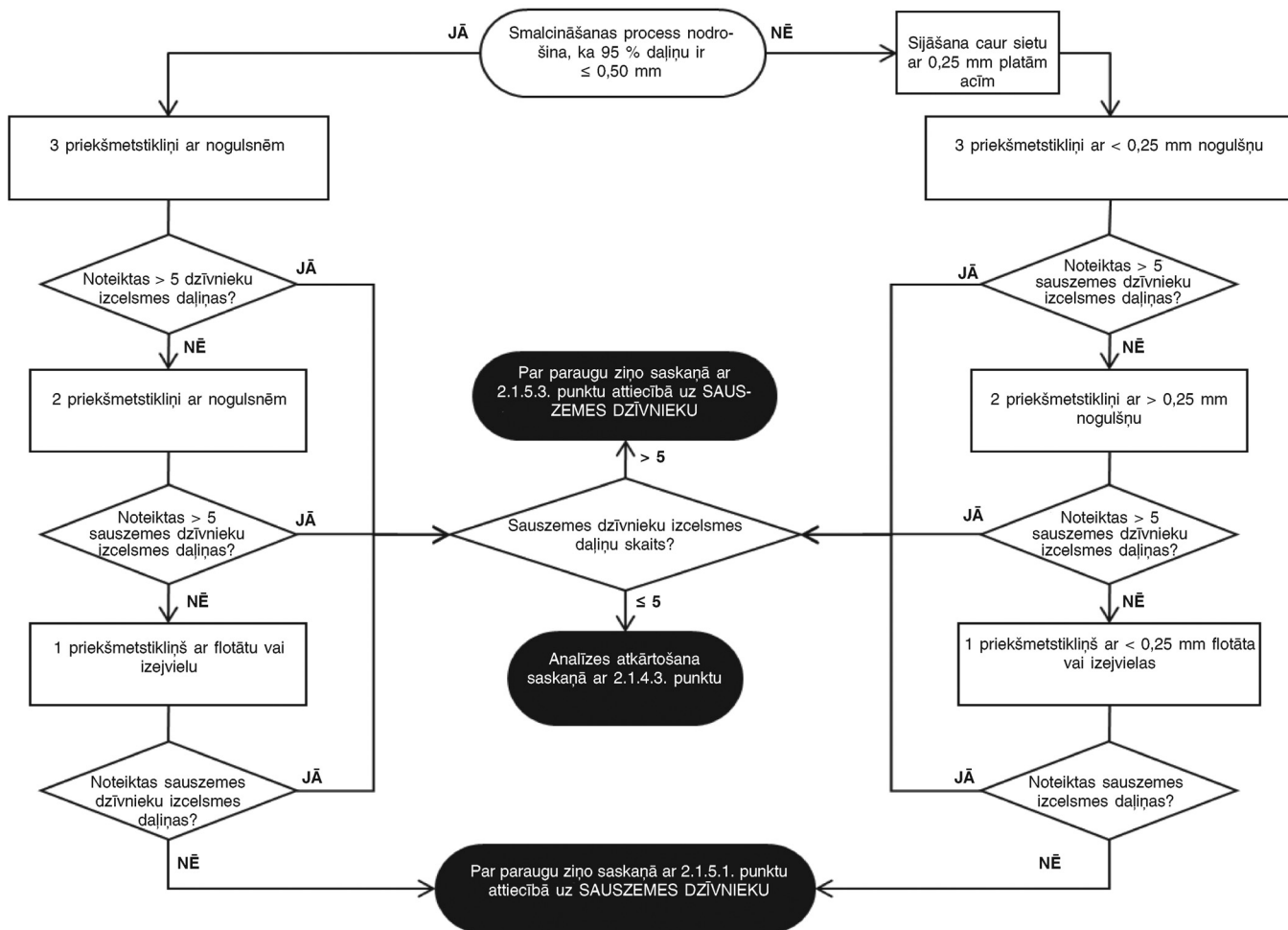
1. diagramma

Novērojumu protokols dzīvnieku izcelsmes sastāvdaļu noteikšanai tādos barības maisījumos un barības līdzekļos, kas nav zivju milti



2. diagramma

Novērojumu protokols dzīvnieku izcelsmes daļiņu noteikšanai zivju miltos



2.1.4.3. Noteikšanu skaits

Ja pēc pirmās noteikšanas, kas veikta saskaņā ar noteikšanas protokolu, kurš izklāstīts attiecīgi 1. vai 2. diagrammā, nenosaka konkrēta veida (t. i., sauszemes dzīvnieku vai zivju) dzīvnieku izcelsmes daļiņas, nav jāveic papildu noteikšana, un analīzes rezultātu paziņo, izmantojot 2.1.5.1. punktā noteikto terminoloģiju.

Ja pēc pirmās noteikšanas, kas veikta saskaņā ar noteikšanas protokoliem, kas izklāstīti attiecīgi 1. vai 2. diagrammā, noteiktais konkrēta veida (t. i., sauszemes dzīvnieku vai zivju) dzīvnieku izcelsmes daļiņu kopējais skaits ir no vienas līdz piecām daļiņām, veic otro noteikšanu, izmantojot 50 g jauna pakārtota parauga. Ja pēc šīs otrās noteikšanas šāda konkrēta veida dzīvnieku izcelsmes daļiņu skaits ir no nulles līdz piecām daļiņām, analīzes rezultātu paziņo, izmantojot 2.1.5.2. punktā noteikto terminoloģiju; citādā gadījumā veic trešo noteikšanu ar 50 g jauna pakārtota parauga. Tomēr, ja pēc pirmās un otrās noteikšanas konkrēta veida daļiņu skaits, kas noteikts šo divu noteikšanu laikā, ir lielāks par 15, nav jāveic papildu noteikšana, un analīzes rezultātu tieši paziņo, izmantojot 2.1.5.3. punktā noteikto terminoloģiju. Ja pēc trešās noteikšanas konkrēta veida daļiņu skaits, kas noteikts šo trīs noteikšanu laikā, ir lielāks par 15, analīzes rezultātu paziņo, izmantojot 2.1.5.3. punktā noteikto terminoloģiju. Citādā gadījumā analīzes rezultātu paziņo, izmantojot 2.1.5.2. punktā noteikto terminoloģiju.

Ja pēc pirmās noteikšanas, kas veikta saskaņā ar noteikšanas protokoliem, kuri norādīti attiecīgi 1. vai 2. diagrammā, nosaka vairāk nekā piecas konkrēta veida (t. i., sauszemes dzīvnieku vai zivju) dzīvnieku izcelsmes daļiņas, analīzes rezultātu paziņo, izmantojot 2.1.5.3. punktā noteikto terminoloģiju.

2.1.5. Rezultātu izteikšana

Paziņojot rezultātus, laboratorija norāda to, kāda veida materiāls ir bijis analizēts (nogulsnes, flotāts vai izejviela) un cik noteikšanas ir veiktas.

Laboratorijas ziņojumā jābūt vismaz informācijai par tādu sastāvdaļu klātbūtni, kuru izcelsme ir no sauszemes dzīvniekiem vai zivīm.

Par dažādajām situācijām paziņo šādi.

2.1.5.1. Nav noteikta konkrēta veida dzīvnieku izcelsmes daļiņa:

— cik varēja saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā neatrada nevienu daļiņu, kuras izcelsme ir no sauszemes dzīvniekiem,

— cik varēja saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā neatrada nevienu daļiņu, kuras izcelsme ir no zivīm.

2.1.5.2. Noteiktas vidēji viena līdz piecas konkrēta veida dzīvnieku izcelsmes daļiņas:

— cik varēja saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā neatrada vairāk kā piecas daļiņas, kuru izcelsme ir no sauszemes dzīvniekiem. Daļiņas identificēja kā ... [kauls, skrimslis, muskulis, spalva, rags...]. Šāds zems klātbūtnes līmenis, kas nepārsniedz mikroskopiskās metodes noteikšanas robežu, nozīmē, ka nav izslēdzams šķietami pozitīva rezultāta risks,

vai, ja piemērojams,

— cik varēja saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā neatrada vairāk kā piecas daļiņas, kuru izcelsme ir no zivīm. Daļiņas identificēja kā ... [asaka, zvīņas, skrimslis, muskulis, otolīts, žaunas...]. Šāds zems klātbūtnes līmenis, kas nepārsniedz mikroskopiskās metodes noteikšanas robežu, nozīmē, ka nav izslēdzams šķietami pozitīva rezultāta risks.

Ja paraugs ir bijis priekšsijāts, laboratorijas ziņojumā min, kāda veida frakcijā (sijātā frakcijā, granulētā frakcijā vai kodolos) ir noteiktas dzīvnieku izcelsmes daļiņas, ja tikai sijātajā frakcijā noteiktas dzīvnieku izcelsmes daļiņas var liecināt par vides piesārņojumu.

2.1.5.3. Noteiktas vidēji vairāk nekā piecas konkrēta veida dzīvnieku izcelsmes daļiņas:

— cik varēja saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā atrada vairāk nekā piecas daļiņas, kuru izcelsme ir no sauszemes dzīvniekiem. Daļiņas identificēja kā ... [kauls, skrimslis, muskulis, spalva, ragi...],

vai, ja piemērojams,

— cik varēja saskatīt ar gaismas mikroskopu, iesniegtajā paraugā atrada vairāk nekā piecas daļiņas, kuru izcelsme ir no zivīm. Daļiņas identificēja kā ... [asaka, zviņas, skrimslis, muskulis, otolīts, žaunas...].

Ja paraugs ir bijis priekšsijāts, laboratorijas ziņojumā min, kāda veida frakcijā (sijātā frakcijā, granulētā frakcijā vai kodolos) ir noteiktas dzīvnieku izcelsmes daļiņas, jo tikai sijātajā frakcijā noteiktas dzīvnieku izcelsmes daļiņas var liecināt par vides piesārņojumu.

2.2. PQR

2.2.1. Princips

Dzīvnieku izcelsmes dezoksiribonukleīnskābes (DNS) fragmentus, kas var būt barības sastāvdaļās un barības maisījumos, nosaka ar PQR, izmantojot gēnu amplifikācijas tehniku, kas vērsta uz sugām raksturīgām DNS sekvencēm.

Lai pielietotu PQR metodi, no sākuma jāveic DNS ekstrakcija. Pēc tam iegūtajam DNS ekstraktam piemēro amplifikāciju, lai noteiktu dzīvnieku sugas, uz kurām vērsta analīze.

2.2.2. Reāģenti un aprīkojums

2.2.2.1. Reāģenti:

2.2.2.1.1. Reāģenti DNS ekstrakcijai

Izmanto tikai tos reāģentus, ko apstiprinājusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi EURL-AP.

2.2.2.1.2. Reāģenti gēnu amplifikācijai

2.2.2.1.2.1. Prameri un zondes

Izmanto tikai EURL-AP apstiprinātus oligonukleotīdu sekvenču pramerus un zondes ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Master Mix

Izmanto tikai tos *Master Mix* šķīdumus, kas nesatur reāģentus, kuri dzīvnieku izcelsmes DNS klātbūtnes ietekmē varētu radīt nepareizus rezultātus ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Reāģenti piesārņojuma attīrīšanai

2.2.2.1.2.3.1. Sālsskābes šķīdums (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Balinātājs (nātrija hipohlorīta šķīdums ar 0,15 % aktīvā hlora)

2.2.2.1.2.3.3. Nekodīgi reāģenti tādu dārgu iekārtu kā analītisko svaru (piemēram, MP Biomedicals ražotais DNA EraseTM) attīrīšanai no piesārņojuma

2.2.2.2. Aprīkojums

2.2.2.2.1. Analītiskie svāri ar precizitāti līdz 0,001 g

2.2.2.2.2. Smalcināšanas ierīce

2.2.2.2.3. Termoprocēss reāllaika PQR

2.2.2.2.4. Mikrocentrifūgas mēģeņu centrifūga

2.2.2.2.5. Mikropipešu komplekts 1 µl līdz 1 000 µl lieliem pilieniem

2.2.2.2.6. Molekulārās bioloģijas standarta plastmasas izstrādājumi: mikrocentrifūgas mēģenes, mikropipešu plastmasas uzgaļi ar filtru, termoprocēss piemērotas plates

2.2.2.2.7. Saldētavas paraugu un reāģentu glabāšanai

⁽¹⁾ Saraksts ar šiem prameriem un zondēm katrai dzīvnieku sugai, uz kuru ir vērsta analīze, ir pieejams EURL-AP tīmekļa vietnē.

⁽²⁾ Funkcionālu *Master Mix* piemēri ir pieejami EURL-AP tīmekļa vietnē.

- 2.2.3. *Paraugu ņemšana un paraugu sagatavošana*
- 2.2.3.1. *Paraugu ņemšana*
Izmanto reprezentatīvu paraugu, kas ņemts saskaņā ar I pielikumā izklāstītajiem noteikumiem.
- 2.2.3.2. *Paraugu sagatavošana*
Laboratorijas paraugu sagatavošana līdz pat DNS ekstrakcijai atbilst II pielikumā norādītajām prasībām. Vismaz 50 g parauga ņem pakārtota parauga analīzei un tad samal.
Paraugu sagatavo atsevišķā telpā, ko neizmanto DNS ekstrakcijai un gēnu amplifikācijas reakcijām, kā aprakstīts ISO 24276.
Sagatavo divus paraugus, no kuriem katrs sver vismaz 100 mg.
- 2.2.4. *DNS ekstrakcija*
DNS ekstrakciju veic katram paraugam, kas sagatavots, izmantojot SOP, ko izveidojusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi EURL-AP.
Saskaņā ar ISO 24276 katrai ekstrakcijas partijai veic divas ekstrakcijas kontroles:
— ekstrakcijas tukšā parauga kontroli,
— DNS ekstrakcijas pozitīvo kontroli.
- 2.2.5. *Gēnu amplifikācija*
Gēnu amplifikāciju veic, izmantojot katrai identificējamajai sugai apstiprinātās metodes. Minētās metodes ir noteiktas SOP, ko izveidojusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi EURL-AP. Lai novērtētu inhibīciju, katru DNS ekstraktu analizē vismaz divos dažādos atšķaidījumos.
Saskaņā ar ISO 24276 katrai mērķa sugai veic divas amplifikācijas kontroles:
— katrai PQR analīžu partijai vai platei izmanto mērķa DNS pozitīvo kontroli,
— katrai PQR analīžu platei vai partijai izmanto amplifikācijas reaģenta kontroli (saukta arī par bezmatricas kontroli).
- 2.2.6. *Rezultātu interpretēšana un izteikšana*
Ziņojot par rezultātiem, laboratorija norāda vismaz analizēto paraugu svaru, izmantoto ekstrakcijas metodi, noteikšanas reižu skaitu un metodes noteikšanas robežu.
Rezultātus neinterpretē un par tiem neziņo, ja DNS ekstrakcijas pozitīvā kontrole un mērķa DNS pozitīvās kontroles nesniedz pozitīvus rezultātus par analizēto mērķi, bet amplifikācijas reaģenta kontrole ir negatīva.
Ja divu paraugu rezultāti ir nekonsekventi, atkārti vismaz gēnu amplifikāciju. Ja laboratorijai ir aizdomas par to, ka nekonsekvences iemesls var būt DNS ekstrakti, pirms rezultātu interpretēšanas veic jaunu DNS ekstrakciju, kam seko gēnu amplifikācija.
Galīgos rezultātus izsaka, integrējot un interpretējot šo divu paraugu rezultātus saskaņā ar SOP, ko izstrādājusi un savā tīmekļa vietnē publicējusi EURL-AP.
- 2.2.6.1. *Negatīvs rezultāts*
Par negatīvu rezultātu ziņo šādi:
iesniegtajā paraugā netika konstatēts X DNS (X ir dzīvnieku suga vai dzīvnieku sugas grupa, uz kuru vērsta analīze).
- 2.2.6.2. *Pozitīvs rezultāts*
Par pozitīvu rezultātu ziņo šādi:
iesniegtajā paraugā netika konstatēts X DNS (X ir dzīvnieku suga vai dzīvnieku sugas grupa, uz kuru vērsta analīze)."
-