VERORDENING (EU) Nr. 51/2013 VAN DE COMMISSIE

van 16 januari 2013

tot wijziging van Verordening (EG) nr. 152/2009 wat betreft de analysemethoden voor de bepaling van bestanddelen van dierlijke oorsprong in het kader van de officiële controle van diervoeders

(Voor de EER relevante tekst)

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gezien het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gezien Verordening (EG) nr. 882/2004 van het Europees Parlement en de Raad van 29 april 2004 inzake officiële controles op de naleving van de wetgeving inzake diervoeders en levensmiddelen en de voorschriften inzake diergezondheid en dierenwelzijn ([1]), en met name artikel 11, lid 4,

Overwegende hetgeen volgt:

(1) Artikel 7, lid 1, van Verordening (EG) nr. 999/2001 van het Europees Parlement en de Raad van 22 mei 2001 houdende vaststelling van voorschriften inzake preventie, bestrijding en uitroeiing van bepaalde overdraagbare spongiforme encefalopathieën ([2]) bepaalt dat het gebruik van van dieren afkomstige eiwitten in de voeding van herkauwers verboden is. Dat verbod wordt uitgebreid tot niet-herkauwers en beperkt, voor wat betreft de voedering van dergelijke dieren, tot producten van dierlijke oorsprong overeenkomstig bijlage IV bij die verordening.

(2) Ingevolge artikel 11, lid 1, van Verordening (EG) nr. 1069/2009 van het Europees Parlement en de Raad van 21 oktober 2009 tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften inzake niet voor menselijke consumptie bestemde dierlijke bijproducten en afgeleide producten en tot intrekking van Verordening (EG) nr. 1774/2002 ([3]) is het verboden landdieren, met uitzondering van pelsdieren, te voederen met verwerkte dierlijke eiwitten die afkomstig zijn van dieren of delen van dieren van dezelfde diersoort; ook is het verboden gekweekte vissen te voederen met verwerkte dierlijke eiwitten die afkomstig zijn van gekweekte vis of delen van gekweekte vis van dezelfde soort.

(3) Bijlage VI bij Verordening (EG) nr. 152/2009 van de Commissie van 27 januari 2009 tot vaststelling van de bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders ([4]) bevat de analysemethoden voor de bepaling van bestanddelen van dierlijke oorsprong in het kader van de officiële controle van diervoeders. Met de microscopische methode, momenteel de enige gevalideerde methode om de aanwezigheid van dierlijke eiwitten in diervoeders aan te tonen, kan een onderscheid worden gemaakt tussen van landdieren afkomstige bestanddelen en van vissen afkomstige bestanddelen, maar het gehalte aan dierlijke bestanddelen in diervoeders kan hiermee niet voldoende nauwkeurig worden bepaald; die methode dient daarvoor dan ook niet gebruikt te worden.

(4) Het EU-referentielaboratorium voor dierlijke eiwitten in diervoeders heeft een nieuwe methode voor het aantonen van dierlijke bestanddelen gevalideerd, die gebaseerd is op de polymerasekettingreactie (PCR). Uit een implementatiestudie in samenwerking met de nationale referentielaboratoria van de lidstaten is gebleken dat de nieuwe methode voldoende robuust is om als officiële controlemethode in de Unie gebruikt te worden. Met deze nieuwe methode kunnen dierlijke bestanddelen in diervoeders worden aangetoond en kan ook worden bepaald van welke diersoort zij afkomstig zijn. Deze methode zou, in combinatie met of ter vervanging van de microscopische methode, bijzonder nuttig zijn om de correcte uitvoering van de voederverboden van de Verordeningen (EG) nr. 999/2001 en (EG) nr. 1069/2009 te controleren.

(5) Bijlage VI bij Verordening (EG) nr. 152/2009 moet daarom dienovereenkomstig worden vervangen.

(6) De in deze verordening vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid, en het Europees Parlement noch de Raad heeft zich ertegen verzet,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

Bijlage VI bij Verordening (EG) nr. 152/2009 wordt vervangen door de tekst in de bijlage bij deze verordening.

([1]) PB L 165 van 30.4.2004, blz. 1.
([2]) PB L 147 van 31.5.2001, blz. 1.
([3]) PB L 300 van 14.11.2009, blz. 1.
([4]) PB L 54 van 26.2.2009, blz. 1.

Artikel 2

Deze verordening treedt in werking op de twintigste dag na die van de bekendmaking ervan in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke lidstaat.

Gedaan te Brussel, 16 januari 2013.

Voor de Commissie
De voorzitter
José Manuel BARROSO

BIJLAGE

„BIJLAGE VI

ANALYSEMETHODEN VOOR DE BEPALING VAN BESTANDDELEN VAN DIERLIJKE OORSPRONG IN HET KADER VAN DE OFFICIËLE CONTROLE OP DIERVOEDERS

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

De bepaling van bestanddelen van dierlijke oorsprong in diervoeders wordt uitgevoerd met behulp van lichtmicroscopie of de polymerasekettingreactie (PCR) overeenkomstig de bepalingen van deze bijlage.

Met deze twee methoden kunnen bestanddelen van dierlijke oorsprong in voedermiddelen en mengvoeders worden aangetoond. Het gehalte aan die bestanddelen in voedermiddelen en mengvoeders kan met deze methoden echter niet worden berekend. Beide methoden hebben een aantoonbaarheidsgrens van minder dan 0,1 % (m/m).

Met de PCR-methode kan worden bepaald tot welke taxonomische groep de bestanddelen van dierlijke oorsprong in voedermiddelen en mengvoeders behoren.

Deze methoden gelden voor de controle op de toepassing van de verbodsbepalingen van artikel 7, lid 1, en bijlage IV van Verordening (EG) nr. 999/2001 en artikel 11, lid 1, van Verordening (EG) nr. 1069/2009.

Afhankelijk van het soort diervoeder dat wordt onderzocht kunnen deze methoden afzonderlijk of in combinatie in één protocol worden gebruikt overeenkomstig de standaardwerkvoorschriften die door het EU-referentielaboratorium voor dierlijke eiwitten in diervoeders (EURL-AP) zijn vastgesteld en te vinden zijn op de website van dat laboratorium ([1]).

2. METHODEN

2.1. **Lichtmicroscopie**

2.1.1. *Beginsel*

De bestanddelen van dierlijke oorsprong die kunnen worden aangetroffen in voedermiddelen en mengvoeders die ter analyse worden aangeboden, worden geïdentificeerd op basis van typische microscopisch identificeerbare kenmerken zoals spierweefsel en andere vleesdeeltjes, kraakbeen, bot, hoorn, haar, bloed, veren, eierschalen, visgraten en schubben.

2.1.2. *Reagentia en uitrusting*

2.1.2.1. Reagentia

2.1.2.1.1. Sedimentatievloeistof

2.1.2.1.1.1. Tetrachlooretheen (dichtheid 1,62).

2.1.2.1.2. Kleurstof

2.1.2.1.2.1. Alizarineroodoplossing (verdun 2,5 ml zoutzuur 1 M in 100 ml water en voeg hieraan 200 mg alizarinerood toe).

2.1.2.1.3. Insluitmiddelen

2.1.2.1.3.1. Loog (NaOH 2,5 % m/V of KOH 2,5 % m/V).

2.1.2.1.3.2. Glycerol (onverdund, viscositeit 1 490 cP).

2.1.2.1.3.3. Norland Optical Adhesive 65® (viscositeit 1 200 cP) of een hars met gelijkwaardige eigenschappen voor het maken van permanente preparaten.

2.1.2.1.4. Als insluitmiddel te gebruiken kleurstoffen

2.1.2.1.4.1. Lugoloplossing (los 2 g kaliumjodide op in 100 ml water en voeg onder geregeld schudden 1 g jood toe).

([1]) http://eurl.craw.eu/

2.1.2.1.4.2. Cystinereagens (2 g loodacetaat, 10 g NaOH/100 ml water).

2.1.2.1.4.3. Fehlingsreagens (vóór gebruik bereid uit gelijke delen (1:1) van twee voorraadoplossingen A en B. Oplossing A: los 6,9 g koper(II)sulfaat-pentahydraat op in 100 ml water. Oplossing B: los 34,6 g kaliumnatriumtartraat-tetrahydraat en 12 g NaOH op in 100 ml water).

2.1.2.1.4.4. Tetramethylbenzidine/waterstofperoxide (los 1 g 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) op in 100 ml ijsazijn en 150 ml water. Meng voor gebruik vier delen van deze TMB-oplossing met één deel 3 %-ige waterstofperoxide.

2.1.2.1.5. Wasvloeistoffen

2.1.2.1.5.1. Ethanol ≥ 96 % (technisch zuiver).

2.1.2.1.5.2. Aceton (technisch zuiver).

2.1.2.1.6. Bleekmiddel

2.1.2.1.6.1. Natriumhypochlorietoplossing, in handelskwaliteit (9-14 % actief chloor).

2.1.2.2. Uitrusting

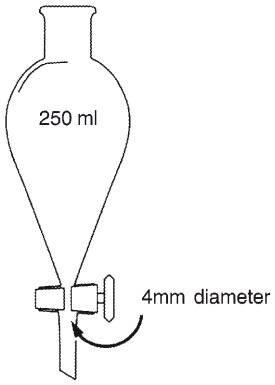
2.1.2.2.1. Analytische balans, nauwkeurigheid 0,001 g.

2.1.2.2.2. Verkleiningsapparatuur: maalmolen of vijzel.

2.1.2.2.3. Zeven met vierkante mazen van 0,25 mm en 1 mm maaswijdte.

2.1.2.2.4. Conische glazen scheitrechter, inhoud 250 ml, van onderen voorzien van een kraan van teflon of geslepen glas, uitloopdiameter ≥ 4 mm. In plaats hiervan mag een imhoffglas worden gebruikt, mits het laboratorium heeft aangetoond dat hiermee gelijkwaardige detectieniveaus kunnen worden behaald als met de scheitrechter.

Scheitrechter



2.1.2.2.5. Stereomicroscoop eindvergroting minimaal 6,5×-40×.

2.1.2.2.6. Samengestelde microscoop, eindvergroting minimaal 100×-400×, doorvallend licht, helderveld. Daarnaast mag van gepolariseerd licht en differentieel interferentiecontrast gebruik worden gemaakt.

2.1.2.2.7. Gebruikelijk laboratoriumglaswerk.

2.1.2.2.8. Uitrusting voor het maken van preparaten: standaard-objectglaasjes, holle objectglaasjes, dekglaasjes (20 × 20 mm), pincet, smalle spatel.

2.1.3. *Bemonstering en monstervoorbereiding*

2.1.3.1. Bemonstering

Er wordt uitgegaan van een representatief monster dat is genomen overeenkomstig bijlage I.

2.1.3.2. Voorzorgsmaatregelen

Om kruisverontreiniging in het laboratorium te vermijden moet alle herbruikbare uitrusting vóór gebruik zorgvuldig gereinigd worden. De scheitrechter moet voor het reinigen uit elkaar worden genomen. De onderdelen van de scheitrechter en het glaswerk worden eerst met de hand en vervolgens machinaal gewassen. De zeven moeten worden gereinigd met een borstel met harde, synthetische haren. Na het zeven van vettig materiaal zoals vismeel wordt aangeraden de zeven tot slot nog met aceton en perslucht te reinigen.

2.1.3.3. Voorbereiding van monsters, met uitzondering van monsters van oliën of vetten

2.1.3.3.1. Drogen: monsters met een hoger vochtgehalte dan 14 % worden vóór behandeling gedroogd.

2.1.3.3.2. Voorzeven: het wordt aanbevolen diervoeder in pellets en pitten voor te zeven met 1 mm maaswijdte en beide fracties als afzonderlijke monsters te analyseren.

2.1.3.3.3. Nemen van deelmonsters en malen: van het monster wordt een deelmonster voor analyse genomen van ten minste 50 g, dat wordt gemalen.

2.1.3.3.4. Afscheiding en bereiding van het sediment: breng 10 g van het gemalen deelmonster (tot op 0,01 g nauwkeurig afgewogen) in de scheitrechter of het imhoffglas en voeg 50 ml tetrachlooretheen toe. In het geval van vismeel of andere puur dierlijke producten, minerale ingrediënten of voormengsels die meer dan 10 % sediment opleveren, wordt maximaal 3 g in de scheitrechter gebracht. Schud het mengsel gedurende minimaal 30 s krachtig, en voeg daarna voorzichtig ten minste 50 ml tetrachlooretheen toe langs de binnenwand van de trechter om de aangehechte deeltjes weg te spoelen. Laat het resulterende mengsel ten minste 5 min staan en scheid vervolgens het sediment af door de kraan te openen.

Bij gebruik van een imhoffglas wordt het mengsel gedurende ten minste 15 s krachtig geroerd waarna eventuele deeltjes aan de binnenwand van het glas zorgvuldig worden weggespoeld met ten minste 10 ml zuiver tetrachlooretheen. Laat het mengsel vervolgens 3 min staan en roer daarna opnieuw gedurende 15 s, waarna eventuele deeltjes tegen de binnenwand van het glas zorgvuldig worden weggespoeld met ten minste 10 ml zuiver tetrachlooretheen. Laat het resulterende mengsel ten minste 5 min staan en schenk de vloeibare fractie daarna voorzichtig af zonder dat het sediment meekomt.

Het sediment wordt gedroogd en vervolgens gewogen (tot op 0,001 g nauwkeurig). Als meer dan 5 % van het sediment bestaat uit deeltjes met een diameter groter dan 0,50 mm, wordt het gezeefd met een maaswijdte van 0,25 mm en worden beide fracties onderzocht.

2.1.3.3.5. Afscheiding en bereiding van het flotaat: na afscheiding van het sediment zoals hierboven beschreven moeten in de scheitrechter twee fasen achtergebleven zijn: een vloeibare fase bestaande uit tetrachlooretheen en een vaste fase van drijvend materiaal. Deze vaste fase is het flotaat en wordt verkregen door de kraan van de scheitrechter te openen en het tetrachlooretheen volledig te laten uitlopen. Vervolgens wordt de scheitrechter omgekeerd, waarna het flotaat in een grote petrischaal wordt gebracht en in een zuurkast wordt gedroogd. Als meer dan 5 % van het flotaat bestaat uit deeltjes met een diameter groter dan 0,50 mm, wordt het gezeefd met een maaswijdte van 0,25 mm en worden beide fracties onderzocht.

2.1.3.3.6. Bereiding van het ruwe materiaal: er wordt ten minste 5 g van het gemalen deelmonster bereid. Als meer dan 5 % van het materiaal bestaat uit deeltjes met een diameter groter dan 0,50 mm, wordt het gezeefd met een maaswijdte van 0,25 mm en worden beide fracties onderzocht.

2.1.3.4. Voorbereiding van monsters van oliën of vetten

Het volgende protocol moet worden gevolgd voor de voorbereiding van monsters van oliën en vetten:

— verwarm vast vet in een oven tot het gesmolten is;

— pipetteer 40 ml vet of olie van het onderste gedeelte van het monster in een centrifugebuis;

— centrifugeer gedurende 10 min bij 4 000 omwentelingen per minuut;

— als het vet na centrifugeren vast is, verwarm het dan in een oven tot het gesmolten is;

— centrifugeer nogmaals gedurende 5 min bij 4 000 omwentelingen per minuut;

— breng de helft van de gedecanteerde onzuiverheden met een lepel of spatel over op een objectglaasje voor microscopisch onderzoek; als insluitmiddel wordt glycerol aanbevolen;

— de resterende onzuiverheden worden gebruikt voor sedimentatie zoals beschreven in punt 2.1.3.3.

2.1.3.5. Gebruik van kleurstoffen

Om de bestanddelen van dierlijke oorsprong gemakkelijker correct te kunnen identificeren kan de analist bij de voorbereiding van de monsters kleurstoffen gebruiken volgens de richtsnoeren van het EURL-AP, die op de website van dat laboratorium te vinden zijn.

Bij gebruik van alizarineroodoplossing voor kleuring van het sediment geldt het volgende protocol:

— breng het gedroogde sediment over in een glazen reageerbuis en spoel tweemaal met ongeveer 5 ml ethanol (beide keren 30 s vortexen, ongeveer 1 min 30 s laten bezinken en de vloeistof afschenken);

— bleek het sediment door toevoeging van ten minste 1 ml natriumhypochlorietoplossing. Laat gedurende 10 min reageren. Vul de reageerbuis met water, laat het sediment 2-3 min bezinken en schenk het water en de gesuspendeerde deeltjes voorzichtig af;

— spoel het sediment vervolgens tweemaal met ongeveer 10 ml water (beide keren 30 s vortexen, laten bezinken en het water afschenken);

— voeg 2-10 druppels alizarineroodoplossing toe en vortex het mengsel. Laat 30 s reageren en spoel het gekleurde sediment tweemaal met ongeveer 5 ml ethanol en vervolgens eenmaal met aceton (beide keren 30 s vortexen, ongeveer 1 min laten bezinken en de vloeistof afschenken);

— droog het gekleurde sediment.

2.1.4. *Microscopisch onderzoek*

2.1.4.1. Bereiding van de preparaten

Er worden microscopische preparaten vervaardigd van het sediment en, naar keuze van de analist, van het flotaat of het ruwe materiaal. Indien het monster bij de voorbereiding gezeefd is, worden beide fracties (fijn en grof) gebruikt. De op de objectglaasjes aangebrachte analysemonsters moeten representatief zijn voor de hele fractie.

Het aantal vervaardigde preparaten moet voldoende zijn om het volledige onderzoekprotocol van punt 2.1.4.2 uit te voeren.

De preparaten worden ingesloten met geschikt insluitmiddel overeenkomstig de standaardwerkvoorschriften van het EURL-AP, die te vinden zijn op de website van dat laboratorium. De preparaten worden met dekglaasjes afgedekt.

2.1.4.2. Protocollen voor microscopische detectie van deeltjes van dierlijke oorsprong in mengvoeders en voedermiddelen

De microscopische preparaten worden bekeken volgens het protocol in figuur 1 voor mengvoeders en voedermiddelen met uitzondering van puur vismeel of volgens het protocol in figuur 2 voor puur vismeel.

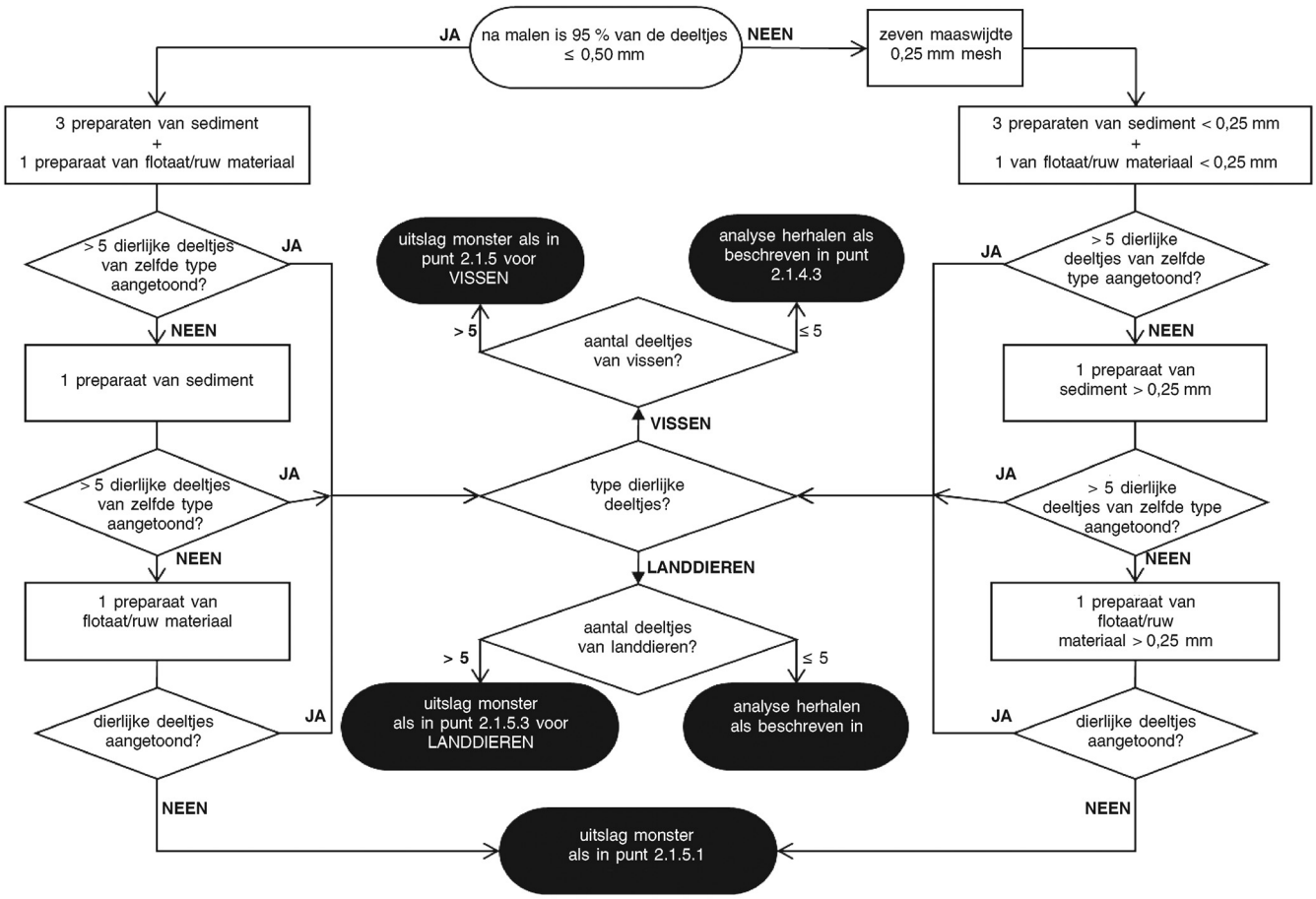
Het microscopisch onderzoek wordt uitgevoerd met de samengestelde microscoop op het sediment en, naar keuze van de analist, op het flotaat of het ruwe materiaal. Voor de grove fracties kan behalve de samengestelde microscoop ook de stereomicroscoop worden gebruikt. Elk preparaat wordt in zijn geheel bij diverse vergrotingen onderzocht.

Het minimumaantal preparaten dat in elke stap van het protocol moet worden onderzocht, moet strikt worden aangehouden, tenzij de fractie te klein is om het voorgeschreven aantal preparaten te maken. Maximaal worden zes preparaten per bepaling onderzocht.

Om de aard en oorsprong van de deeltjes gemakkelijker te kunnen vaststellen mag de analist gebruikmaken van hulpmiddelen als beslissingsondersteunende systemen, beeldbanken en referentiemonsters.

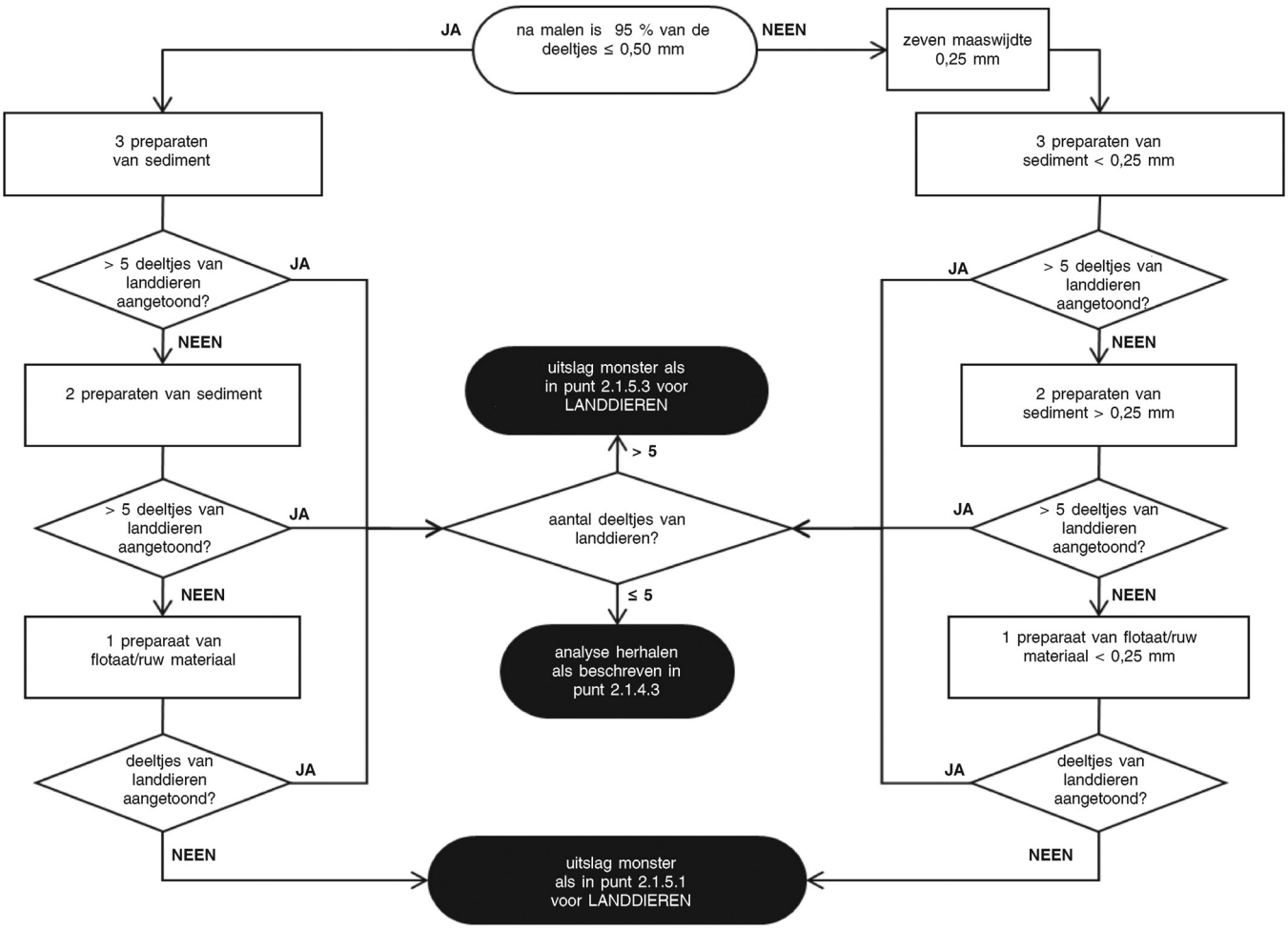
Figuur 1

Protocol voor microscopische detectie van deeltjes van dierlijke oorsprong in mengvoeders en voedermiddelen met uitzondering van vismeel



Figuur 2

Protocol voor microscopische detectie van deeltjes van dierlijke oorsprong in vismeel



2.1.4.3. Aantal bepalingen

Als in een eerste bepaling overeenkomstig het protocol van figuur 1 of figuur 2, al naar het geval, geen deeltjes van dierlijke oorsprong van een bepaald type (landdier of vis) worden aangetoond, is geen verdere bepaling nodig en wordt het analyseresultaat uitgedrukt zoals aangegeven in punt 2.1.5.1.

Al in een eerste bepaling overeenkomstig het protocol van figuur 1 of figuur 2, al naar het geval, het totale aantal aangetoonde deeltjes van dierlijke oorsprong van een bepaald type (landdier of vis) minimaal 1 en maximaal 5 is, wordt een tweede bepaling uitgevoerd met een nieuw deelmonster van 50 g. Als bij deze tweede bepaling het aantal aangetoonde deeltjes van dierlijke oorsprong van dit type maximaal 5 is, wordt het analyseresultaat uitgedrukt zoals aangegeven in punt 2.1.5.2; is dit niet het geval, dan wordt een derde bepaling uitgevoerd met een nieuw deelmonster van 50 g. Als echter na de eerste twee bepalingen de som van het aantal deeltjes van een bepaald type dat in beide bepalingen is aangetoond, groter is dan 15, is geen verdere bepaling nodig en wordt het analyseresultaat direct uitgedrukt zoals aangegeven in punt 2.1.5.3. Als na de derde bepaling het totale aantal deeltjes van dierlijke oorsprong van een bepaald type die in de drie bepalingen samen zijn aangetoond, groter is dan 15, wordt het analyseresultaat uitgedrukt zoals aangegeven in punt 2.1.5.3. Is dit niet het geval, dan wordt het analyseresultaat uitgedrukt zoals aangegeven in punt 2.1.5.2.

Als in een eerste bepaling overeenkomstig het protocol van figuur 1 of figuur 2, al naar het geval, meer dan 5 deeltjes van dierlijke oorsprong van een bepaald type (landdier of vis) worden aangetoond, wordt het analyseresultaat uitgedrukt zoals aangegeven in punt 2.1.5.3.

2.1.5. *Weergave van de resultaten*

Bij de rapportage van de resultaten geeft het laboratorium aan op welk materiaal de analyse is uitgevoerd (sediment, flotaat of ruw materiaal) en hoeveel bepalingen zijn uitgevoerd.

Het laboratoriumverslag bevat ten minste informatie over de aanwezigheid van bestanddelen afkomstig van landdieren en van vissen.

De verschillende situaties worden gerapporteerd zoals hieronder aangegeven.

2.1.5.1. Geen deeltjes van dierlijke oorsprong van een bepaald type aangetoond:

— voor zover met een lichtmicroscoop kon worden waargenomen, zijn in het onderzochte monster geen deeltjes afkomstig van landdieren aangetoond;

— voor zover met een lichtmicroscoop kon worden waargenomen, zijn in het onderzochte monster geen deeltjes afkomstig van vissen aangetoond.

2.1.5.2. Gemiddeld minimaal 1 en maximaal 5 deeltjes van dierlijke oorsprong van een bepaald type aangetoond:

— voor zover met een lichtmicroscoop kon worden waargenomen, zijn in het onderzochte monster gemiddeld per bepaling niet meer dan 5 deeltjes afkomstig van landdieren aangetoond. De deeltjes werden geïdentificeerd als … [bot, kraakbeen, spier, haar, hoorn…]. Deze geringe aanwezigheid, die onder de aantoonbaarheidsgrens van de microscopische methode ligt, betekent dat het risico op een fout-positief resultaat niet kan worden uitgesloten;

dan wel, al naar het geval:

— voor zover met een lichtmicroscoop kon worden waargenomen, zijn in het onderzochte monster gemiddeld per bepaling niet meer dan 5 deeltjes afkomstig van vissen aangetoond. De deeltjes werden geïdentificeerd als … [graat, schub, kraakbeen, spier, otoliet, kieuw…]. Deze geringe aanwezigheid, die onder de aantoonbaarheidsgrens van de microscopische methode ligt, betekent dat het risico op een fout-positief resultaat niet kan worden uitgesloten.

Als het monster voorgezeefd is, wordt in het laboratoriumverslag vermeld in welke fractie (gezeefde fractie, pellets of pitten) de deeltjes van dierlijke oorsprong zijn aangetoond; worden alleen in de gezeefde fractie deeltjes van dierlijke oorsprong aangetoond, dan kan dat duiden op milieuverontreiniging.

2.1.5.3. Gemiddeld meer dan 5 deeltjes van dierlijke oorsprong van een bepaald type aangetoond:

— voor zover met een lichtmicroscoop kon worden waargenomen, zijn in het onderzochte monster gemiddeld per bepaling meer dan 5 deeltjes afkomstig van landdieren aangetoond. De deeltjes werden geïdentificeerd als … [bot, kraakbeen, spier, haar, hoorn…];

dan wel, al naar het geval:

— voor zover met een lichtmicroscoop kon worden waargenomen, zijn in het onderzochte monster gemiddeld per bepaling meer dan 5 deeltjes afkomstig van vissen aangetoond. De deeltjes werden geïdentificeerd als … [graat, schub, kraakbeen, spier, otoliet, kieuw…].

Als het monster voorgezeefd is, wordt in het laboratoriumverslag vermeld in welke fractie (gezeefde fractie, pellets of pitten) de deeltjes van dierlijke oorsprong zijn aangetoond; worden alleen in de gezeefde fractie deeltjes van dierlijke oorsprong aangetoond, dan kan dat duiden op milieuverontreiniging.

2.2. **PCR**

2.2.1. *Beginsel*

In voedermiddelen of mengvoeders aanwezige fragmenten desoxyribonucleïnezuur (DNA) van dierlijke oorsprong worden aangetoond door amplificatie van soortspecifieke DNA-sequenties met behulp van PCR.

Eerst moet het DNA worden geëxtraheerd. Met het aldus verkregen DNA-extract wordt de amplificatiestap uitgevoerd om de met de test gezochte diersoort te kunnen aantonen.

2.2.2. *Reagentia en apparatuur*

2.2.2.1. Reagentia

2.2.2.1.1. Reagentia voor DNA-extractie.

Er mogen alleen door het EURL-AP goedgekeurde reagentia worden gebruikt, zoals vermeld op de website van dat laboratorium.

2.2.2.1.2. Reagentia voor DNA-amplificatie.

2.2.2.1.2.1. Primers en probes.

Er mogen alleen primers en probes met oligonucleotidesequenties worden gebruikt die door het EURL-AP zijn gevalideerd ([1]).

2.2.2.1.2.2. Mastermix.

Er mogen alleen mastermix-oplossingen worden gebruikt die vrij zijn van reagentia die fout-positieve resultaten kunnen veroorzaken door de aanwezigheid van dierlijk DNA ([2]).

2.2.2.1.2.3. Decontaminatiemiddelen.

2.2.2.1.2.3.1. Zoutzuur (0,1 N).

2.2.2.1.2.3.2. Chloorbleekmiddel (natriumhypochlorietoplossing met 0,15 % actief chloor).

2.2.2.1.2.3.3. Niet-corrosieve decontaminatiemiddelen voor kostbare apparatuur zoals analytische balansen (bv. DNA Erase™ van MP Biomedicals).

2.2.2.2. Uitrusting

2.2.2.2.1. Analytische balans, nauwkeurigheid 0,001 g.

2.2.2.2.2. Verkleiningsapparatuur.

2.2.2.2.3. Thermocycler voor realtime PCR.

2.2.2.2.4. Microcentrifuge voor microcentrifugebuizen.

2.2.2.2.5. Reeks micropipetten voor het pipetteren van hoeveelheden van 1 µl tot 1 000 µl.

2.2.2.2.6. Gebruikelijke kunststofartikelen voor moleculaire biologie: microcentrifugebuizen, kunststof micropipet-punten met filter, voor gebruik in de thermocycler geschikte platen.

2.2.2.2.7. Vrieskasten voor het bewaren van monsters en reagentia

([1]) De lijst van deze primers en probes voor elke met de test gezochte diersoort is te vinden op de website van het EURL-AP.
([2]) Voorbeelden van bruikbare mastermixen zijn te vinden op de website van het EURL-AP.

2.2.3. *Bemonstering en monstervoorbereiding*

2.2.3.1. Bemonstering

Er wordt uitgegaan van een representatief monster dat is genomen overeenkomstig bijlage I.

2.2.3.2. Voorbereiding van het monster

De voorbereiding van de laboratoriummonsters tot aan de DNA-extractie wordt uitgevoerd volgens de voorschriften van bijlage II. Van het monster wordt een deelmonster voor analyse genomen van ten minste 50 g, dat wordt gemalen.

De monsters worden voorbereid in een andere ruimte dan de ruimten waar de DNA-extractie en DNA-amplificatie plaatsvinden, zoals beschreven in ISO-norm 24276.

Er worden twee analysemonsters van elk minimaal 100 mg voorbereid.

2.2.4. *DNA-extractie*

Van elk analysemonster wordt het DNA geëxtraheerd overeenkomstig de standaardwerkvoorschriften van het EURL-AP, die te vinden zijn op de website van dat laboratorium.

Voor elke extractiereeks worden twee extractiecontroles gemaakt zoals beschreven in ISO-norm 24276:

— een extractieblanco;

— een positieve DNA-extractiecontrole.

2.2.5. *DNA-amplificatie*

De DNA-amplificatie wordt uitgevoerd met de voor alle te identificeren diersoorten gevalideerde methoden. Die methoden staan vermeld in de standaardwerkvoorschriften van het EURL-AP, die te vinden zijn op de website van dat laboratorium. Elk DNA-extract wordt in ten minste twee verdunningen geanalyseerd om eventuele inhibitie te beoordelen.

Per gezochte diersoort worden twee amplificatiecontroles gemaakt zoals beschreven in ISO-norm 24276:

— een positieve DNA-doeldiercontrole voor elke plaat of reeks PCR-tests;

— een amplificatiereagenscontrole („no template control”) voor elke plaat of reeks PCR-tests.

2.2.6. *Interpretatie en weergave van de resultaten*

Bij de rapportage vermeldt het laboratorium ten minste de massa van de gebruikte analysemonsters, de gebruikte extractiemethode, het aantal uitgevoerde bepalingen en de aantoonbaarheidsgrens van de methode.

De resultaten mogen niet geïnterpreteerd en gerapporteerd worden als de positieve DNA-extractiecontrole en de positieve DNA-doeldiercontrole geen positieve resultaten voor de gezochte diersoort opleveren terwijl de amplificatiereagenscontrole negatief is.

Als de resultaten van de twee analysemonsters niet overeenstemmen, moet ten minste de amplificatiestap worden herhaald. Als het laboratorium vermoedt dat de DNA-extracten de oorzaak van de discrepantie zijn, moeten een nieuwe DNA-extractie en -amplificatie worden uitgevoerd voordat de resultaten geïnterpreteerd worden.

De uiteindelijke weergaven van de resultaten berust op de combinatie en interpretatie van de resultaten van beide analysemonsters overeenkomstig de standaardwerkvoorschriften van het EURL-AP, die te vinden zijn op de website van dat laboratorium.

2.2.6.1. Negatief resultaat

Een negatief resultaat wordt als volgt gerapporteerd:

In het onderzochte monster is geen DNA van X aangetoond (waarbij X die diersoort of groep diersoorten is waarnaar met de test werd gezocht).

2.2.6.2. Positief resultaat

Een positief resultaat wordt als volgt gerapporteerd:

In het onderzochte monster is een DNA van X aangetoond (waarbij X die diersoort of groep diersoorten is waarnaar met de test werd gezocht).”