

REGULAMENTUL (UE) NR. 51/2013 AL COMISIEI

din 16 ianuarie 2013

de modificare a Regulamentului (CE) nr. 152/2009 în ceea ce privește metodele de analiză pentru determinarea constituenților de origine animală pentru controlul oficial al furajelor

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (CE) nr. 882/2004 al Parlamentului European și al Consiliului din 29 aprilie 2004 privind controalele oficiale efectuate pentru a asigura verificarea conformității cu legislația privind hrana pentru animale și produsele alimentare și cu normele de sănătate animală și de bunăstare a animalelor ⁽¹⁾, în special articolul 11 alineatul (4),

întrucât:

- (1) Articolul 7 alineatul (1) din Regulamentul (CE) nr. 999/2001 al Parlamentului European și al Consiliului din 22 mai 2001 de stabilire a unor reglementări pentru prevenirea, controlul și eradicarea anumitor forme transmisibile de encefalopatie spongiformă ⁽²⁾ prevede că se interzice utilizarea proteinelor animale în nutriția rumegătoarelor. Această interdicție se extinde și asupra altor animale decât rumegătoarele și se limitează, în ceea ce privește nutriția acestor animale cu produse de origine animală, în conformitate cu anexa IV la regulamentul respectiv.
- (2) Articolul 11 alineatul (1) din Regulamentul (CE) nr. 1069/2009 al Parlamentului European și al Consiliului din 21 octombrie 2009 de stabilire a unor norme sanitare privind subprodusele de origine animală și produsele derivate care nu sunt destinate consumului uman și de abrogare a Regulamentului (CE) nr. 1774/2002 ⁽³⁾ interzice hrănirea animalelor terestre dintr-o anumită specie, cu excepția animalelor pentru blană, cu proteine animale prelucrate care provin din cadavre sau părți de cadavre ale altor animale din aceeași specie, precum și hrănirea peștilor de fermă cu proteine animale prelucrate care provin din cadavre sau părți de cadavre ale altor pești de crescătorie din aceeași specie.
- (3) Regulamentul (CE) nr. 152/2009 al Comisiei din 27 ianuarie 2009 de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽⁴⁾ stabilește

în anexa VI metodele de analiză pentru determinarea constituenților de origine animală pentru controlul oficial al furajelor. Metoda microscopică, care este în prezent singura metodă validată pentru a detecta prezența proteinelor animale în furaje, este în măsură să facă distincție între prezența constituenților derivați din animale terestre și prezența constituenților derivați din pești, dar nu este în măsură să cuantifice cu un grad suficient de precizie cantitatea de constituenți de origine animală prezentă în furaje și, prin urmare, nu ar trebui să fie utilizată în acest scop.

- (4) O nouă metodă de detectare a constituenților de origine animală bazată pe reacția în lanț a polimerazei (PCR) a fost validată de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale. În urma unui studiu de punere în aplicare organizat cu laboratoarele naționale de referință din statele membre, s-a dovedit că noua metodă este suficient de solidă pentru a fi utilizată ca metodă de control oficial în Uniune. Această nouă metodă este în măsură să detecteze prezența constituenților de origine animală în furaje și, de asemenea, să identifice specia de origine a acestor constituenți. Utilizarea acestei noi metode în combinație cu sau pentru a înlocui, după caz, metoda microscopică ar fi foarte valoroasă pentru controlul punerii în aplicare corecte a interdicțiilor referitoare la nutriție prevăzute în Regulamentele (CE) nr. 999/2001 și (CE) nr. 1069/2009.
- (5) Prin urmare, anexa VI la Regulamentul (CE) nr. 152/2009 ar trebui înlocuită în consecință.
- (6) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală și nu au întâmpinat nicio opoziție din partea Parlamentului European sau a Consiliului,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Anexa VI la Regulamentul (CE) nr. 152/2009 se înlocuiește cu textul din anexa la prezentul regulament.

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

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 16 ianuarie 2013.

Pentru Comisie
Președintele
José Manuel BARROSO

ANEXĂ

„ANEXA VI

METODE DE ANALIZĂ PENTRU DETERMINAREA CONSTITUENȚILOR DE ORIGINE ANIMALĂ PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL FURAJELOR

1. SCOPUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Determinarea constituenților de origine animală în furaje se efectuează prin microscopie optică sau reacție în lanț a polimerazei (PCR), în conformitate cu dispozițiile stabilite în prezenta anexă.

Aceste două metode fac posibilă detectarea prezenței constituenților de origine animală în materiile prime furajere și furajele combinate. Totuși, ele nu fac posibilă calcularea cantității acestor constituenți în materiile prime furajere și furajele combinate. Ambele metode au o limită de detecție sub 0,1 % (g/g).

Metoda PCR face posibilă identificarea grupului taxonomic al constituenților de origine animală prezenți în materiile prime furajere și furajele combinate.

Aceste metode se aplică pentru controlul aplicării interdicțiilor prevăzute la articolul 7 alineatul (1) și anexa IV la Regulamentul (CE) nr. 999/2001 și la articolul 11 alineatul (1) din Regulamentul (CE) nr. 1069/2009.

În funcție de tipul de furaj în curs de testare, aceste metode pot fi utilizate, în cadrul unui singur protocol operațional, fie singure, fie combinate împreună în conformitate cu procedurile standard de operare (PSO) stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia ⁽¹⁾.

2. METODE

2.1. **Microscopie optică**2.1.1. *Principiu*

Constituenții de origine animală care pot fi prezenți în materiile prime furajere și furajele combinate trimise pentru a fi analizate se identifică pe baza caracteristicilor tipice, identificabile prin examinare microscopică, cum ar fi fibre musculare și alte particule de carne, cartilajii, oase, coarne, păr, păr de porc, sânge, pene, coji de ouă, oase și solzi de pește.

2.1.2. *Reactivi și echipamente*

2.1.2.1. Reactivi

2.1.2.1.1. Agent de concentrare

2.1.2.1.1.1. Tetracloretilenă (greutate specifică 1,62)

2.1.2.1.2. Agent de colorare

2.1.2.1.2.1. Soluție de roșu de alizarină (se diluează 2,5 ml acid clorhidric 1M în 100 ml apă și se adaugă 200 mg roșu de alizarină în soluția obținută)

2.1.2.1.3. Mediu de montare

2.1.2.1.3.1. Leșie (NaOH 2,5 % g/v sau KOH 2,5 % g/v)

2.1.2.1.3.2. Glicerol (nediluat, vâscozitate: 1 490 cP)

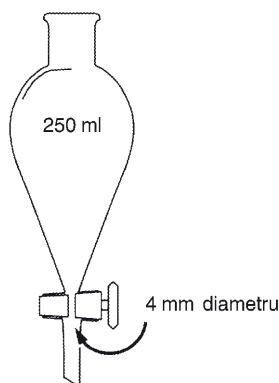
2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (vâscozitate: 1 200 cP) sau o rășină cu proprietăți echivalente pentru pregătirea lamelor permanente

2.1.2.1.4. Mediu de montare cu proprietăți de colorare

2.1.2.1.4.1. Soluție Lugol (se dizolvă 2 g iodură de potasiu în 100 ml apă și se adaugă 1 g de iod agitând frecvent)

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2. Reactiv cistină (2 g acetat de plumb, 10 g NaOH/100 ml apă)
- 2.1.2.1.4.3. Reactiv Fehling [preparat înainte de utilizare din părți egale (1/1) a două soluții stoc A și B. Soluția A: se dizolvă 6,9 g sulfat de cupru (II) pentahidrat în 100 ml apă. Soluția B: se dizolvă 34,6 g tartrat de sodiu și potasiu tetrahidrat și 12 g NaOH în 100 ml apă]
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidină/Peroxid de hidrogen [se dizolvă 1 g de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidină (TMB) în 100 ml de acid acetic glacial și 150 ml apă. Înainte de utilizare, se amestecă patru părți din această soluție TMB cu o parte de peroxid de hidrogen 3 %]
- 2.1.2.1.5. Agenți de limpezire
- 2.1.2.1.5.1. Etanol ≥ 96 % (puritate tehnică)
- 2.1.2.1.5.2. Acetonă (puritate tehnică)
- 2.1.2.1.6. Agent de decolorare
- 2.1.2.1.6.1. Soluție comercială de hipoclorit de sodiu (9-14 % clor activ)
- 2.1.2.2. Echipamente
- 2.1.2.2.1. Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Echipament de măcinare: moară sau mojar
- 2.1.2.2.3. Site cu ochiuri pătrate de 0,25 mm și 1 mm lățime
- 2.1.2.2.4. Pâlnie de separare conică din sticlă cu un conținut de 250 ml cu robinet din teflon sau din sticlă șlefuită la baza conului. Diametrul de deschidere al robinetului trebuie să fie ≥ 4 mm. De asemenea, se poate folosi un pahar de sedimentare cu fund conic, cu condiția ca laboratorul să fi demonstrat că nivelurile de detecție sunt echivalente cu cele obținute utilizând pâlnia de separare conică din sticlă.

Pâlnie de separare

- 2.1.2.2.5. Microscop stereoscopic care să acopere cel puțin o gamă de amplificare finală de la 6,5 la 40 de ori
- 2.1.2.2.6. Microscop compus care acoperă cel puțin o gamă de amplificare finală de la 100 la 400 de ori, în câmp luminos cu lumină transmisă. Se pot utiliza, în plus, lumina polarizată și contrastul interferențial diferențial
- 2.1.2.2.7. Sticlărie de laborator standard
- 2.1.2.2.8. Echipamente pentru pregătirea lamelor: lame de microscop clasice, lame tubulare, lame de acoperire (20 × 20 mm), pensete, spatulă fină
- 2.1.3. Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor
- 2.1.3.1. Eșantionare
- Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu dispozițiile prevăzute în anexa I.

2.1.3.2. Precauțiile ce trebuie luate

Pentru a se evita contaminarea încrucișată în laborator, toate echipamentele reutilizabile sunt curățate cu grijă înainte de utilizare. Piesele pâlniei de separare sunt demontate înainte de curățare. Piesele pâlniei de separare și sticlăria sunt prespălate manual și apoi spălate în mașina de spălat. Sitele sunt curățate utilizând o perie cu peri sintetici aspri. Se recomandă curățarea finală a sitelor cu acetona și aer comprimat după cernerea materiilor grase, precum făina de pește.

2.1.3.3. Pregătirea eșantioanelor, altele decât grăsimi sau uleiuri

2.1.3.3.1. Uscarea eșantioanelor: eșantioanele cu un conținut de umiditate > 14 % se usucă înainte de tratare.2.1.3.3.2. Cernerea în prealabil a eșantioanelor: se recomandă să se cernă în prealabil la 1 mm furajele sub formă de pelete și grăunțele și apoi să se pregătească și să se analizeze cele două fracțiuni rezultate ca eșantioane distincte.2.1.3.3.3. Subeșantionarea și măcinarea: cel puțin 50 g din eșantion constituie subeșantioane pentru a fi analizate și ulterior măcinate.2.1.3.3.4. Extragerea și prepararea sedimentului: o porțiune de 10 g (cu o precizie de 0,01 g) din subeșantionul măcinat este transferată în pâlnia de separare sau în paharul de sedimentare cu fund conic și se adaugă 50 ml de tetracloretilenă. Porțiunea transferată în pâlnie este limitată la 3 g în cazul făinii de pește sau al altor produse de origine animală pure, ingrediente minerale sau preamestecuri care generează sedimente în proporție de peste 10 %. Amestecul se scutură energic cel puțin 30 de secunde și se mai adaugă cu atenție cel puțin 50 ml de tetracloretilenă în timp ce se spală suprafața interioară a pâlniei pentru a îndepărta orice urmă de particule. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin cinci minute înainte de a separa sedimentul prin deschiderea robinetului.

Dacă se utilizează un pahar de sedimentare cu fund conic, se agită energic amestecul cel puțin 15 secunde și particulele care rămân pe pereții paharului sunt spălate cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de tetracloretilenă curată. Amestecul se lasă să stea 3 minute și apoi se agită din nou 15 secunde, iar particulele care rămân pe pereții paharului sunt spălate cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de tetracloretilenă curată. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin 5 minute și apoi fracțiunea lichidă se înlătură și se elimină prin decantare atentă, având grijă să nu se piardă nimic din sediment.

Sedimentul se usucă și apoi se cântărește (cu o precizie de 0,001 g). Dacă peste 5 % din sediment constă în particule > 0,50 mm, se cerne la 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate.

2.1.3.3.5. Extragerea și prepararea reziduului de flotație: după recuperarea sedimentului prin metoda descrisă mai sus, ar trebui să rămână două faze în pâlnia de separare: una lichidă constând în tetracloretilenă și una solidă alcătuită din material care plutește. Această fază solidă este reziduul de flotație care se recuperează turnând toată tetracloretilena din pâlnie prin deschiderea robinetului. Prin răsturnarea pâlniei de separare, reziduul de flotație este transferat într-o placă Petri mare și uscat la aer într-o hotă de tiraj. Dacă peste 5 % din reziduul de flotație constă în particule > 0,50 mm, se cerne la 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate.2.1.3.3.6. Pregătirea materiei prime: se pregătește o porțiune de cel puțin 5 g de subeșantion măcinat. Dacă peste 5 % din materie constă în particule > 0,50 mm, se cerne la 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate.

2.1.3.4. Pregătirea eșantioanelor constând în grăsimi sau uleiuri

Pentru pregătirea eșantioanelor constând în grăsimi sau uleiuri se aplică următorul protocol:

- dacă grăsimea este solidă, se încălzește într-un cuptor până când devine lichidă;
- cu ajutorul unei pipete, 40 ml de grăsime sau ulei se transferă din partea inferioară a eșantionului într-un tub de centrifugă;
- se centrifughează timp de 10 minute la 4 000 r.p.m.;
- dacă grăsimea este solidă după centrifugare, se încălzește într-un cuptor până când devine lichidă;
- se repetă centrifugarea timp de 5 minute la 4 000 r.p.m.;

- cu ajutorul unei linguri mici sau al unei spatule, jumătate din impuritățile decantate sunt transferate spre examinare către lame microscopice; se recomandă glicerolul ca mediu de montare;
- impuritățile rămase se utilizează pentru prepararea sedimentului astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.3.

2.1.3.5. Utilizarea agenților de colorare

Pentru a facilita identificarea corectă a constituenților de origine animală, operatorul poate utiliza agenți de colorare în timpul pregătirii eșantioanelor, în conformitate cu orientările emise de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia.

În cazul în care se utilizează soluție de roșu de alizarină pentru colorarea sedimentelor, se aplică următorul protocol:

- sedimentul uscat se transferă într-o eprubetă de sticlă și se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solventul se lasă să se decanteze aproximativ 1 minut și 30 de secunde și se elimină prin turnare);
- sedimentul se decolorează adăugându-se cel puțin 1 ml de soluție de hipoclorit de sodiu. Se permite ca reacția să continue 10 minute. Tubul se umple cu apă, sedimentul se lasă să se decanteze 2-3 minute, iar apa și particulele în suspensie se elimină ușor prin turnare;
- sedimentul se mai clătește de două ori cu aproximativ 10 ml de apă (se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, se lasă să se decanteze și se elimină apa prin turnare de fiecare dată);
- se adaugă între 2 și 10 picături de soluție de roșu de alizarină, iar amestecul se agită. Se permite desfășurarea reacției timp de 30 de secunde și sedimentul colorat se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol, apoi o dată cu acetonă (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solventul se lasă să se decanteze aproximativ 1 minut și se elimină prin turnare);
- sedimentul colorat se usucă.

2.1.4. Examinare microscopică

2.1.4.1. Pregătirea lamelor

Lamele microscopice se pregătesc din sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie din reziduu de flotație, fie din materie primă. În cazul în care s-a utilizat cernerea în timpul pregătirii eșantioanelor, se pregătesc cele două fracțiuni rezultate (cea fină și cea grosieră). Porțiunile de testat din fracțiuni întinse pe lame trebuie să fie reprezentative pentru întreaga fracțiune.

Se pregătește un număr suficient de lame pentru a se asigura că se poate efectua un protocol complet de examinare, astfel cum se prevede la punctul 2.1.4.2.

Lamele microscopice se montează cu mediul de montare adecvat în conformitate cu PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. Lamele se acoperă cu lame de acoperire.

2.1.4.2. Protocoale de observare pentru detectarea particulelor animale în furajele combinate și materiile prime furajere

Lamele microscopice pregătite se observă în conformitate cu protocoalele de observare stabilite în diagrama 1 pentru furajele combinate și materiile prime furajere altele decât făina de pește pură sau în diagrama 2 pentru făina de pește pură.

Observațiile microscopice se realizează utilizând microscopul compus pe sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie pe reziduu de flotație, fie pe materia primă. Microscopul stereoscopic poate fi utilizat în plus față de microscopul compus pentru fracțiunile grosiere. Fiecare lamă se examinează în întregime la diferite amplificări.

Numărul minim de lame care trebuie observate în fiecare etapă a protocolului de observare trebuie să fie strict respectat, cu excepția cazului în care întregul material al fracțiunii nu permite să se ajungă la numărul prevăzut de lame. Nu se observă mai mult de 6 lame pentru fiecare determinare.

Pentru a facilita identificarea naturii și originii particulelor, operatorul poate utiliza instrumente de sprijin cum ar fi sisteme de asistare în luarea deciziilor, biblioteci de imagini și eșantioane de referință.

Diagrama 1

Protocol de observare pentru detectarea particulelor animale în furajele combinate și materiile prime furajare altele decât făina de pește

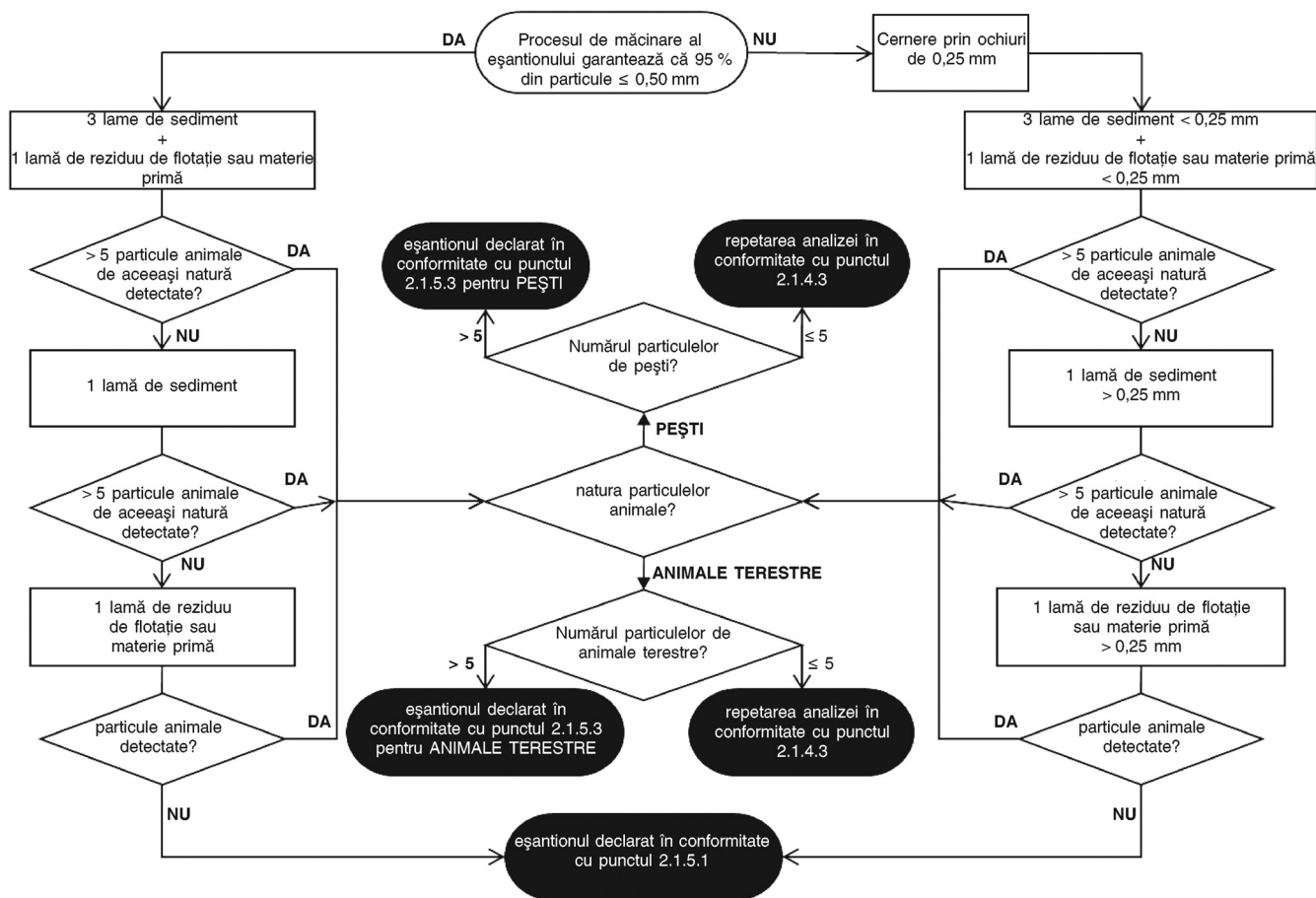
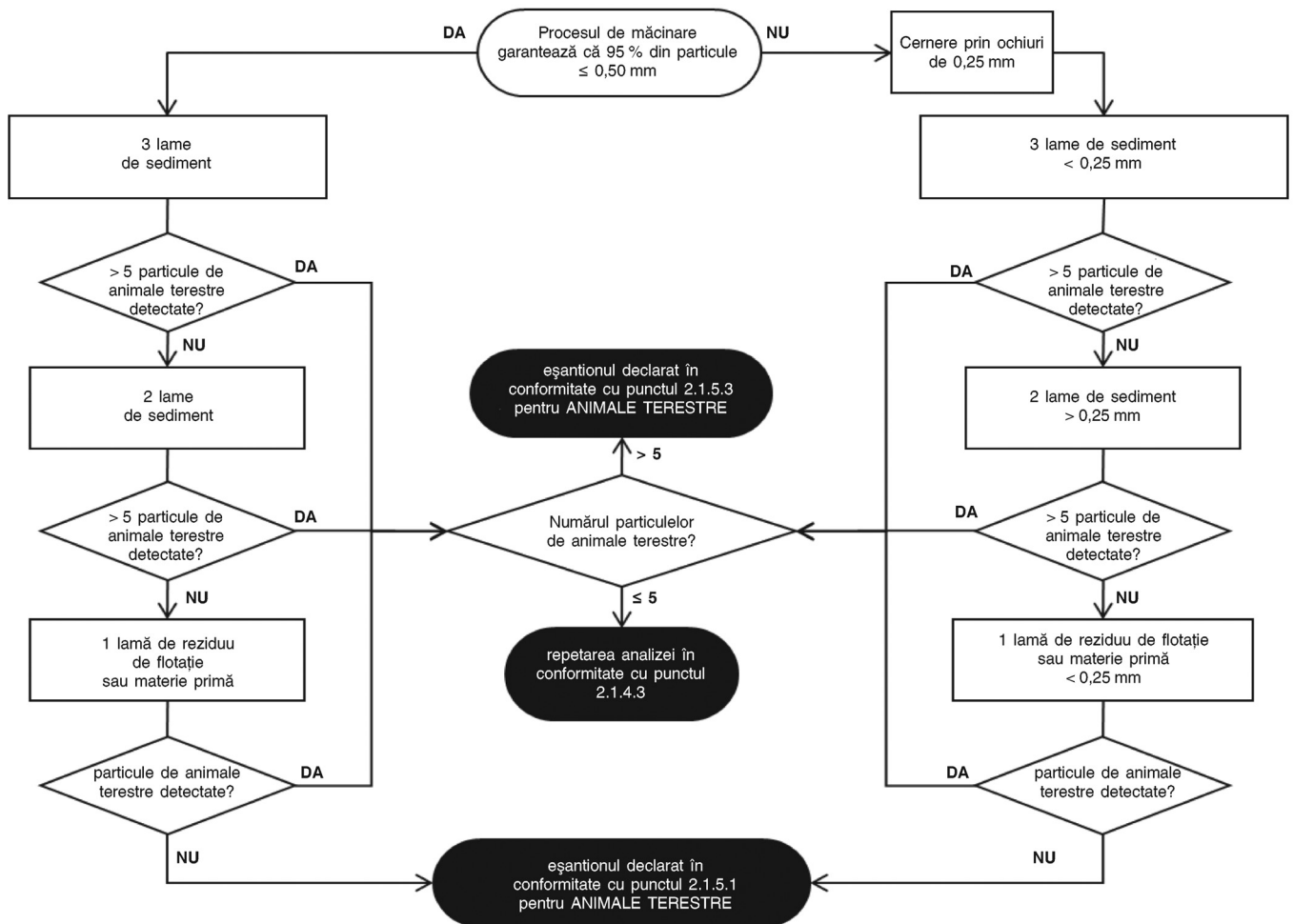


Diagrama 2

Protocol de observare pentru detectarea particulelor animale în făina de pește



2.1.4.3. Numărul determinărilor

Dacă, în urma unei prime determinări efectuate în conformitate cu protocolul de observare stabilit în diagrama 1 sau în diagrama 2, după caz, nu se detectează nicio particulă animală de o anumită natură (de exemplu, animale terestre sau pești), nu este necesară nicio determinare suplimentară, iar rezultatul analizei se raportează utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.1.

Dacă, în urma unei prime determinări efectuate în conformitate cu protocoalele de observare stabilite în diagrama 1 sau în diagrama 2, după caz, numărul total al particulelor animale de o anumită natură (de exemplu, animale terestre sau pești) detectate variază de la 1 la 5, se efectuează o a doua determinare pornind de la un nou subeșantion de 50 g. Dacă, în urma acestei a doua determinări, numărul de particule animale de această anumită natură detectate variază de la 0 la 5, rezultatul analizei se raportează utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.2, dacă nu, se efectuează o a treia determinare pornind de la un nou subeșantion de 50 g. Cu toate acestea, în cazul în care, în urma primei și a celei de a doua determinări, suma particulelor de o anumită natură detectate în cele două determinări este mai mare de 15, nu este necesară nicio determinare suplimentară, iar rezultatul analizei se raportează direct utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.3. Dacă, în urma celei de a treia determinări, suma particulelor animale de o anumită natură detectate pe parcursul celor trei determinări este mai mare de 15, rezultatul analizei se raportează utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.3. Altfel, rezultatul analizei se raportează utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.2.

Dacă, în urma unei prime determinări efectuate în conformitate cu protocoalele de observare stabilite în diagrama 1 sau în diagrama 2, după caz, sunt detectate mai mult de 5 particule animale de o anumită natură (de exemplu, animale terestre sau pești), rezultatul analizei se raportează utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.3.

2.1.5. Exprimarea rezultatelor

Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică pe ce tip de material s-a efectuat analiza (sediment, reziduu de flotație sau materie primă) și câte determinări s-au efectuat.

Raportul laboratorului conține cel puțin informații privind prezența constituenților derivați din animale terestre și din pești.

Diferitele situații se raportează în modul următor:

2.1.5.1. Nicio particulă animală de o anumită natură detectată:

- în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu a fost detectată nicio particulă derivată din animale terestre;
- în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu a fost detectată nicio particulă derivată din pești.

2.1.5.2. Între 1 și 5 particule animale de o anumită natură detectate în medie:

- în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu au fost detectate mai mult de 5 particule derivate din animale terestre, în medie, pentru fiecare determinare. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilagiu, mușchi, păr, coarne ...]. Această prezență scăzută, fiind sub limita de detecție a metodei microscopice, înseamnă că nu se poate exclude riscul unui fals rezultat pozitiv.

Sau, după caz,

- în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu au fost detectate mai mult de 5 particule derivate din pești, în medie, pentru fiecare determinare. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilagiu, mușchi, otolit, branhii...]. Această prezență scăzută, fiind sub limita de detecție a metodei microscopice, înseamnă că nu se poate exclude riscul unui fals rezultat pozitiv.

În cazul cernerii în prealabil a eșantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost detectate particulele animale, întrucât detectarea particulelor animale numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului.

2.1.5.3. Mai mult de 5 particule animale de o anumită natură detectate în medie:

- în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat au fost detectate mai mult de 5 particule derivate din animale terestre în medie pentru fiecare determinare. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilagiu, mușchi, păr, coarne ...].

Sau, după caz,

— în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat au fost detectate mai mult de 5 particule derivate din pești în medie pentru fiecare determinare. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilajiu, mușchi, otolit, branhii...].

În cazul cererii în prealabil a eșantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost detectate particulele animale, întrucât detectarea particulelor animale numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului.

2.2. PCR

2.2.1. Principiu

Fragmentele de acid dezoxiribonucleic (ADN) de origine animală care pot fi prezente în materiile prime furajere și furajele combinate sunt detectate printr-o tehnică de amplificare genetică prin PCR, care vizează secvențe de ADN specifice speciei.

Metoda PCR necesită, în primul rând, o etapă de extragere a ADN-ului. Etapa de amplificare se aplică ulterior extractului de ADN astfel obținut, în vederea detectării speciilor de animale vizate de test.

2.2.2. Reactivi și echipamente

2.2.2.1. Reactivi

2.2.2.1.1. Reactivi pentru etapa de extragere a ADN-ului

Se utilizează numai reactivii aprobați de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicați pe site-ul internet al acestuia.

2.2.2.1.2. Reactivi pentru etapa de amplificare genetică

2.2.2.1.2.1. Primeri și sonde

Se utilizează numai primerii și sondele cu secvențe de oligonucleotide validate de către laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Amestecul principal

Se utilizează doar soluțiile de amestec principal care nu conțin reactivi susceptibili să conducă la rezultate false datorită prezenței de ADN animal ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Reactivi de decontaminare

2.2.2.1.2.3.1. Soluție de acid clorhidric (0,1N)

2.2.2.1.2.3.2. Înălbitor (soluție de hipoclorit de sodiu la 0,15 % din clor activ)

2.2.2.1.2.3.3. Reactivi necorozivi pentru decontaminarea dispozitivelor costisitoare, precum balanțele analitice (de exemplu, DNA EraseTM al MP Biomedicals)

2.2.2.2. Echipamente

2.2.2.2.1. Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g

2.2.2.2.2. Echipament de măcinare

2.2.2.2.3. Thermocycler care permite PCR în timp real

2.2.2.2.4. Microcentrifugă pentru tuburi de microcentrifugare

2.2.2.2.5. Set de micropipete care permit introducerea cu pipeta de la 1 μl până la 1 000 μl

2.2.2.2.6. Material de plastic standard de biologie moleculară: tuburi de microcentrifugare, vârfuri de plastic filtrate pentru micropipete, plăci adecvate pentru thermocycler.

2.2.2.2.7. Congelatoare pentru depozitarea eșantioanelor și reactivilor

⁽¹⁾ Lista acestor primeri și sonde pentru fiecare specie de animale vizată de testare este disponibilă pe site-ul internet al laboratorului de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale.

⁽²⁾ Exemple de amestecuri principale care sunt funcționale sunt disponibile pe site-ul internet al laboratorului de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale.

- 2.2.3. *Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor*
- 2.2.3.1. Eșantionare
Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu dispozițiile prevăzute în anexa I.
- 2.2.3.2. Pregătirea eșantioanelor
Pregătirea eșantioanelor de laborator înainte de extragerea ADN-ului respectă cerințele prevăzute în anexa II. Cel puțin 50 g din eșantion constituie subeșantioane pentru a fi analizate și ulterior măcinate.
Pregătirea eșantioanelor se efectuează într-o încăpere diferită de cele dedicate extragerii ADN-ului și reacțiilor de amplificare genetică descrise în ISO 24276.
Se pregătesc două porțiuni de testat de cel puțin 100 mg fiecare.
- 2.2.4. *Extragerea ADN-ului*
Extragerea ADN-ului se efectuează pe fiecare porțiune de testat pregătită utilizând PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia.
Se pregătesc două controale de extragere pentru fiecare serie de extrageri descrise în ISO 24276:
— un control martor de extragere;
— un control de extragere al ADN-ului pozitiv.
- 2.2.5. *Amplificarea genetică*
Amplificarea genetică se efectuează utilizând metodele validate pentru fiecare specie care necesită identificare. Aceste metode sunt prevăzute în PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. Fiecare extract de ADN se analizează în cel puțin două diluții diferite în scopul de a evalua inhibarea.
Se pregătesc două controale de amplificare pentru fiecare specie țintă, astfel cum se descrie în ISO 24276.
— se utilizează un control țintă al ADN-ului pozitiv pentru fiecare placă sau serie de teste PCR;
— se utilizează un control al reactivului de amplificare (denumit, de asemenea, control fără etalon) pentru fiecare placă sau serie de teste PCR.
- 2.2.6. *Interpretarea și exprimarea rezultatelor*
Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică cel puțin greutatea porțiunilor de testat utilizate, tehnica de extragere utilizată, numărul de determinări efectuate și limita de detecție a metodei.
Rezultatele nu sunt interpretate și raportate în cazul în care controlul de extragere al ADN-ului pozitiv și controalele țintă ale ADN-ului pozitiv nu oferă rezultate pozitive pentru obiectivul care face obiectul testului, în timp ce controlul reactivului de amplificare este negativ.
În cazul în care rezultatele celor două porțiuni de testat nu sunt consecvente, se repetă cel puțin etapa de amplificare genetică. În cazul în care laboratorul suspectează că extractele de ADN pot fi cauza inconsecvenței, se efectuează o nouă extracție de ADN și o altă amplificare genetică înainte de interpretarea rezultatelor.
Exprimarea finală a rezultatelor se bazează pe integrarea și interpretarea rezultatelor celor două porțiuni de testat în conformitate cu PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia.
- 2.2.6.1. Rezultat negativ
Un rezultat negativ este raportat după cum urmează:
Niciun ADN de la X nu a fost detectat în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test).
- 2.2.6.2. Rezultat pozitiv
Un rezultat pozitiv este raportat după cum urmează:
A fost detectat ADN de la X în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test)."