

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) nr 51/2013

av den 16 januari 2013

om ändring av förordning (EG) nr 152/2009 vad gäller analysmetoder för bestämning av beståndsdelar av animaliskt ursprung för offentlig kontroll av foder

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA
FÖRORDNINGmed beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktions-
sätt,med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning
(EG) nr 882/2004 av den 29 april 2004 om offentlig kontroll
för att säkerställa kontrollen av efterlevnaden av foder- och
livsmedelslagstiftningen samt bestämmelserna om djurhälsa
och djurskydd⁽¹⁾, särskilt artikel 11.4, och

av följande skäl:

- (1) Enligt artikel 7.1 i Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 999/2001 av den 22 maj 2001 om fastställande av bestämmelser för förebyggande, kontroll och utrotning av vissa typer av transmissibel spongiform encefalopati⁽²⁾ är det förbjudet att utfodra idisslare med protein som härrör från djur. Förbudet har utvidgats till andra djur än idisslare och, när det gäller utfodringen av dessa djur med produkter av animaliskt ursprung, begränsats i enlighet med bilaga IV till den förordningen.
- (2) Enligt artikel 11.1 i Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1069/2009 av den 21 oktober 2009 om hälsobestämmelser för animaliska biprodukter och därav framställda produkter som inte är avsedda att användas som livsmedel och om upphävande av förordning (EG) nr 1774/2002⁽³⁾ är det förbjudet att utfodra djur av någon viss landlevande djurart, med undantag av pälsdjur, med bearbetat animaliskt protein från djurkroppar eller delar av djurkroppar av samma djurart samt att utfodra odlad fisk med bearbetat animaliskt protein från djurkroppar eller delar av djurkroppar av odlad fisk av samma art.
- (3) I kommissionens förordning (EG) nr 152/2009 av den 27 januari 2009 om provtagnings- och analysmetoder för offentlig kontroll av foder⁽⁴⁾ fastställs i bilaga VI

analysmetoder för bestämning av beståndsdelar av animaliskt ursprung för offentlig kontroll av foder. För närvarande är den enda validerade metoden för att påvisa förekomsten av animaliska proteiner i foder en mikroskopisk metod som kan skilja mellan beståndsdelar av landdjur och beståndsdelar av fisk, men som inte med tillräcklig noggrannhet kan kvantifiera mängden animaliska beståndsdelar i foder. Den metoden bör därför inte användas för detta ändamål.

- (4) En ny metod för påvisande av animaliska beståndsdelar baserad på polymeraskedjereaktion (PCR) har validerats av EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder. En genomförandestudie som anordnades med de nationella referenslaboratorierna i medlemsstaterna visar att den nya metoden är tillräckligt robust för att användas som en offentlig kontrollmetod i unionen. Denna nya metod kan påvisa förekomsten av animaliska beståndsdelar i foder och även identifiera från vilken art beståndsdelarna härrör. Det skulle vara mycket värdefullt att kunna använda denna nya metod i kombination med eller som ersättning för den mikroskopiska metoden, beroende på omständigheterna, vid kontroll av att de utfodringsförbud som fastställs i förordningarna (EG) nr 999/2001 och (EG) nr 1069/2009 tillämpas korrekt.
- (5) Bilaga VI till förordning (EG) nr 152/2009 bör därför ersättas i enlighet med detta.
- (6) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa, och varken Europaparlamentet eller rådet har motsatt sig dem.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilaga VI till förordning (EG) nr 152/2009 ska ersättas med texten i bilagan till den här förordningen.

⁽¹⁾ EUT L 165, 30.4.2004, s. 1.⁽²⁾ EGT L 147, 31.5.2001, s. 1.⁽³⁾ EUT L 300, 14.11.2009, s. 1.⁽⁴⁾ EUT L 54, 26.2.2009, s. 1.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tjugonde dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 16 januari 2013.

På kommissionens vägnar

José Manuel BARROSO

Ordförande

BILAGA

"BILAGA VI

ANALYSMETODER FÖR BESTÄMNING AV BESTÅNDSDELAR AV ANIMALISKT URSPRUNG FÖR OFFENTLIG KONTROLL AV FODER**1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE**

Bestämningen av beståndsdelar av animaliskt ursprung i foder ska utföras med ljusmikroskopi eller polymeraskedjereaktion (PCR) i enlighet med bestämmelserna i denna bilaga.

Med hjälp av dessa två metoder är det möjligt att påvisa förekomsten av beståndsdelar av animaliskt ursprung i foderråvaror och foderblandningar. Däremot går det inte att med dessa metoder beräkna mängden av dessa beståndsdelar i foderråvaror och foderblandningar. Båda metoderna har en detektionsgräns under 0,1 % (w/w).

Med PCR är det möjligt att identifiera den taxonomiska gruppen för de beståndsdelar av animaliskt ursprung som finns i foderråvaror och foderblandningar.

Dessa metoder ska användas vid kontroll av att de förbud som fastställs i artikel 7.1 och bilaga IV till förordning (EG) nr 999/2001 och i artikel 11.1 i förordning (EG) nr 1069/2009 tillämpas.

Beroende på vilken typ av foder som testas kan dessa metoder användas inom ett enda protokoll, antingen ensamma eller i kombination, i enlighet med de standardrutiner (SOP) som fastställs av EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder och som offentliggörs på dess webbplats⁽¹⁾.

2. METODER**2.1 Ljuskioskopi****2.1.1 Princip**

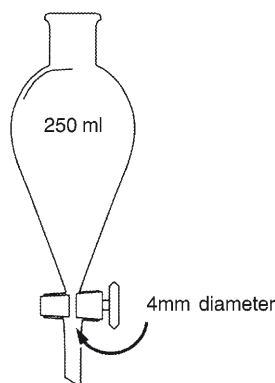
De beståndsdelar av animaliskt ursprung som kan förekomma i de foderråvaror och foderblandningar som sänds för analys identifieras på grundval av typiska egenskaper som kan urskiljas med mikroskop (t.ex. muskelfibrer och andra köttpartiklar, brosk, ben, horn, hår, borst, blod, fjädrar, äggskal, fiskben och fiskfjäll).

2.1.2 Reagens och utrustning**2.1.2.1 Reagens****2.1.2.1.1 Koncentreringsmedel****2.1.2.1.1.1 Tetrakloreten (densitet 1,62).****2.1.2.1.2 Färgreagens****2.1.2.1.2.1 Alizarinlösning (späd 2,5 ml 1 M saltsyra med 100 ml vatten och tillsatt 200 mg alizarin till denna lösning).****2.1.2.1.3 Monteringsmedium****2.1.2.1.3.1 Lut (NaOH 2,5 % w/v eller KOH 2,5 % w/v).****2.1.2.1.3.2 Glycerol (utspädd, viskositet: 1 490 cP).****2.1.2.1.3.3 Norland ® Optical Adhesive 65 (viskositet: 1 200 cP) eller ett harts med motsvarande egenskaper för preparering av permanent fixerade preparat på objektglas.****2.1.2.1.4 Monteringsmedium med färgande egenskaper****2.1.2.1.4.1 Lugols lösning (lös 2 g kaliumjodid i 100 ml vatten och tillsatt 1 g jod under regelbunden omskakning).**

⁽¹⁾ Se <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2 Cystinreagens (2 g blyacetat, 10 g NaOH/100 ml vatten).
- 2.1.2.1.4.3 Fehlings lösning (före användning blandas lika delar (1:1) av stamlösningarna A och B. Lösning A: lös 6,9 g koppar(II)sulfatpentahydrat i 100 ml vatten. Lösning B: lös 34,6 g kaliumnatriumtartrattetrahydrat och 12 g NaOH i 100 ml vatten).
- 2.1.2.1.4.4 Tetrametylbensidin/väteperoxid (lös 1 g 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB) i 100 ml isättika och 150 ml vatten. Före användning blandas 4 delar TMB-lösning med 1 del 3 % väteperoxid).
- 2.1.2.1.5 Sköljmedel
- 2.1.2.1.5.1 Etanol $\geq 96\%$ (teknisk kvalitet).
- 2.1.2.1.5.2 Aceton (teknisk kvalitet).
- 2.1.2.1.6 Blekmedel
- 2.1.2.1.6.1 I handeln förekommande natriumhypokloritlösning (9–14 % aktivt klor).
- 2.1.2.2 Utrustning
- 2.1.2.2.1 Analysvåg med en noggrannhet av 0,001 g.
- 2.1.2.2.2 Utrustning för malning: kvarn eller mortel.
- 2.1.2.2.3 Siktar med kvadratiska maskor med en maskvidd på 0,25 mm och 1 mm.
- 2.1.2.2.4 Konisk separertratt i glas med en volym på 250 ml och med en avstängningsventil i teflon eller slipat glas placerad i botten av tratten. Diametern på avstängningsventilen ska vara minst 4 mm. Alternativt får en sedimentbägare med konisk botten användas, förutsatt att laboratoriet har visat att detektionsgränsen är likvärdig med den som uppnås med den koniska separertratten i glas.

Separertratt



- 2.1.2.2.5 Stereomikroskop med en förstöringsgrad på minst 6,5× till 40×.
- 2.1.2.2.6 Ljusfältsmikroskop med en förstöringsgrad på minst 100× till 400×. Även polariserad ljusmikroskopi och interferenskontrastmikroskopi får användas.
- 2.1.2.2.7 Laboratorieglass av standardtyp.
- 2.1.2.2.8 Utrustning för preparering av objektglas: vanliga objektglas, objektglas med en fördjupning, täckglas (20 × 20 mm), pincett och liten spatel.
- 2.1.3 Provtagning och provberedning
- 2.1.3.1 Provtagning
- Ett representativt prov som tagits i enlighet med bestämmelserna i bilaga I ska användas.

2.1.3.2 Försiktighetsåtgärder

För att undvika korskontaminering i laboratoriet ska all utrustning som används flera gånger rengöras noggrant före användning. Separertrattar ska tas isär före rengöring. Separertrattar och glasvaror ska först diskas för hand och sedan i diskmaskin. Siktat ska rengöras med en borste med styva syntetiska hår. Efter siktningen av fett material såsom fiskmjöl rekommenderas en avslutande rengöring av sikten med aceton och tryckluft.

2.1.3.3 Beredning av andra prov än fett eller olja

2.1.3.3.1 Torkning av prov: Prov med en vattenhalt över 14 % ska torkas före beredning.

2.1.3.3.2 Siktning av prov före beredning: Det rekommenderas att pelleterat foder och palmkärnor siktas genom 1 mm maskor före beredning och att de två fraktionerna därefter bereds och analyseras som separata prov.

2.1.3.3.3 Analysprov och malning: Minst 50 g av provet ska delas upp i analysprov och därefter malas.

2.1.3.3.4 Extraktion och beredning av sediment: En portion på 10 g (med en noggrannhet av 0,01 g) av det malda analysprovet förs över i en separertratt eller en sedimentbägare med konisk botten och 50 ml tetrakloreten tillsätts. När det gäller fiskmjöl eller andra rena animaliska produkter, mineralämnen eller förblandningar som bildar mer än 10 % sediment ska högst 3 g prov föras över i tratten. Blandningen skakas kraftigt i minst 30 sekunder och ytterligare minst 50 ml tetrakloreten tillsätts försiktigt under det att insidan av tratten sköljs för att avlägsna eventuella vidhäftande partiklar. Den erhållna blandningen ska stå i minst fem minuter innan sedimentet avskiljs genom att avstängningsventilen öppnas.

Om en sedimentbägare med konisk botten används ska blandningen omröras kraftigt i minst 15 sekunder och eventuella vidhäftande partiklar på bägarens sidor sköljs noggrant ner med minst 10 ml ren tetrakloreten. Blandningen ska stå i tre minuter och därefter återigen omröras i 15 sekunder och eventuella vidhäftande partiklar på bägarens sidor sköljs noggrant ner med minst 10 ml ren tetrakloreten. Den erhållna blandningen ska stå i minst fem minuter och sedan avlägsnas den flytande fraktionen genom noggrann dekantering så att inget sediment försvinner.

Sedimentet torkas och vägs (med en noggrannhet av 0,001 g). Om mer än 5 % av sedimentet består av partiklar större än 0,50 mm ska det siktas genom 0,25 mm maskor och båda fraktionerna ska undersökas.

2.1.3.3.5 Extraktion och beredning av flotat: Efter att sedimentet tagits fram enligt metoden ovan bör det finnas två faser i separertratten: en vätskefas som består av tetrakloreten och en fast fas som består av flytande material. Den fasta fasen är flotatet och det erhålls genom att avstängningsventilen öppnas och all tetrakloreten hålls bort. Separertratten vänds upp och ner och flotatet överförs till en stor petriskål och lufttorkas därefter i ett dragskåp. Om mer än 5 % av flotatet består av partiklar större än 0,50 mm ska det siktas genom 0,25 mm maskor och båda fraktionerna ska undersökas.

2.1.3.3.6 Beredning av råvara: Minst 5 g av det malda analysprovet ska beredas. Om mer än 5 % av provet består av partiklar större än 0,50 mm ska det siktas genom 0,25 mm maskor och båda fraktionerna ska undersökas.

2.1.3.4 Beredning av prov bestående av fett eller olja

Följande protokoll ska användas vid beredning av prov bestående av fett eller olja:

— Om fettet är fast värms det i en ugn tills det blir flytande.

— Med pipett överförs 40 ml av fettet från botten av provet till ett centrifugrör.

— Centrifugera i tio minuter vid 4 000 varv per minut.

— Om fettet är fast efter centrifugeringen värms det i en ugn tills det blir flytande.

— Upprepa centrifugeringen i fem minuter vid 4 000 varv per minut.

— Med en liten sked eller spatel placeras hälften av de dekanterade föroreningarna på objektglas för mikroskopisk undersökning. Glycerol rekommenderas som moteringsmedium.

— De återstående föroreningarna används för beredning av sedimentet enligt punkt 2.1.3.3.

2.1.3.5 Användning av färgreagens

För att lättare kunna identifiera beståndsdelar av animaliskt ursprung får färgreagens användas vid provberedningen i enlighet med de riktlinjer som utfärdas av EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder och som offentliggörs på dess webbplats.

Om alizarinlösning används för att färga sedimentet ska följande protokoll användas:

— Det torkade sedimentet överförs till ett provrör i glas och sköljs två gånger med ca 5 ml etanol (varje gång vortexas provet i 30 sekunder, lösningen får stå i ca 1½ minut och därefter hålls lösningsmedlet bort).

— Sedimentet bleks genom att minst 1 ml natriumhypokloritlösning tillsätts. Reaktionen får fortsätta i tio minuter. Provröret fylls med vatten, sedimentet får stå i 2–3 minuter och därefter hålls vattnet och de suspenderade partiklarna försiktigt bort.

— Sedimentet sköljs ytterligare två gånger med ca 10 ml vatten (varje gång vortexas provet i 30 sekunder, lösningen får stå och därefter hålls vattnet bort).

— Till sedimentet tillsätts 2–10 droppar alizarinlösning och blandningen vortexas. Reaktionen får pågå i 30 sekunder och det infärgade sedimentet sköljs två gånger med ca 5 ml etanol och sedan en gång med aceton (varje gång vortexas provet i 30 sekunder, lösningen får stå i ca en minut och därefter hålls lösningsmedlet bort).

— Det infärgade sedimentet torkas.

2.1.4 Undersökning i mikroskop

2.1.4.1 Preparering av objektglas

Objektglaset ska prepareras med sediment och antingen med flotat eller med råvara, enligt laborantens eget val. Om provet har siktats vid provberedningen ska båda fraktionerna (den fina och den grova) prepareras. De prov från fraktionerna som fördelas på objektglaset ska vara representativa för hela fraktionen.

Ett tillräckligt antal objektglas ska prepareras så att hela det undersökningsprotokoll som anges i punkt 2.1.4.2 kan utföras.

Objektglaset ska monteras med ett lämpligt monteringsmedium i enlighet med de standardrutiner som fastställs av EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder och som offentliggörs på dess webbplats. Objektglaset ska täckas med täckglas.

2.1.4.2 Undersökningsprotokoll för att påvisa animaliska partiklar i foderblandningar och foderråvaror

De preparerade objektglaset ska undersökas i mikroskop i enlighet med undersökningsprotokollet i diagram 1 för foderblandningar och andra foderråvaror än rent fiskmjöl, eller med undersökningsprotokollet i diagram 2 för rent fiskmjöl.

Den mikroskopiska undersökningen ska utföras på sediment och antingen på flotat eller på råvara, enligt laborantens eget val. För de grova fraktionerna får utöver det vanliga mikroskopet även stereomikroskop användas. Varje objektglas ska undersökas i sin helhet vid olika förstöringsgrader.

Det minsta antalet objektglas som ska undersökas i varje steg av undersökningsprotokollet ska följas strikt, förutom om mängden fraktionsmaterial inte gör det möjligt att uppnå det föreskrivna antalet objektglas. Högst sex objektglas per bestämning ska undersökas.

För att underlätta identifieringen av partiklarnas typ och ursprung får hjälpmedel användas såsom beslutsstödssystem, bildbibliotek och referensprov.

Diagram 1

Undersökningsprotokoll för att påvisa animaliska partiklar i foderblandningar och andra foderråvaror än fiskmjöl

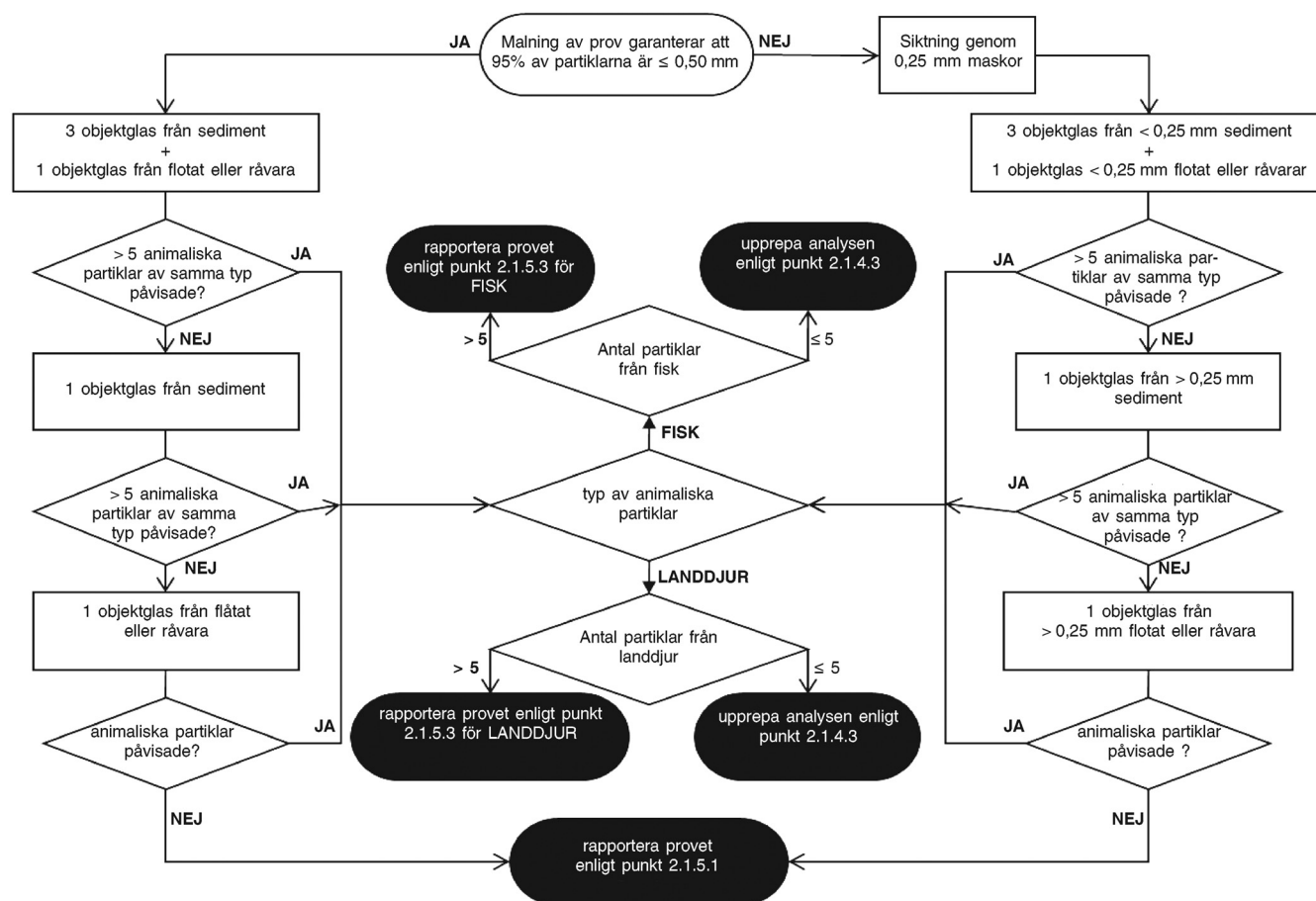
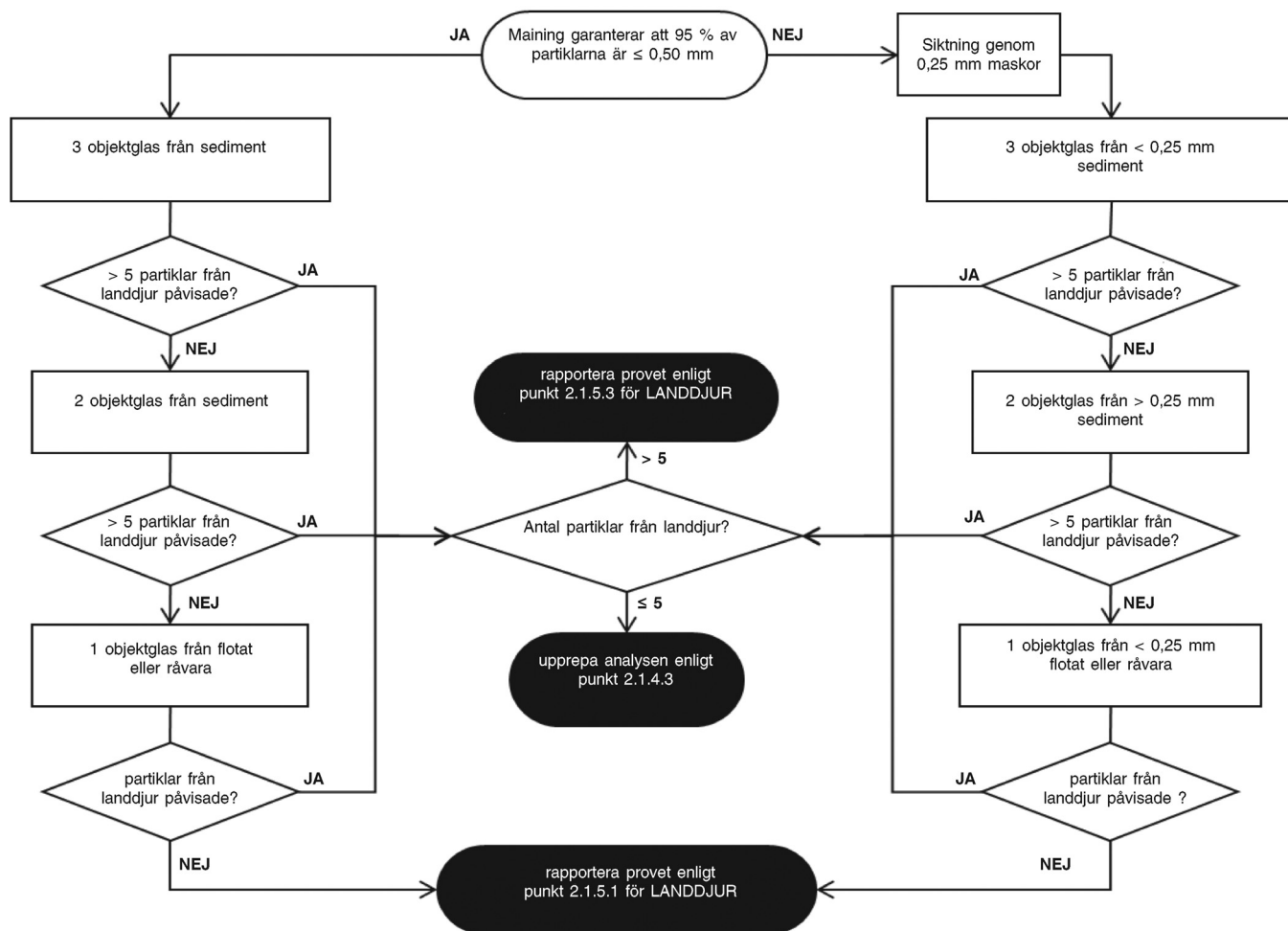


Diagram 2

Undersökningsprotokoll för att påvisa animaliska partiklar i fiskmjöl



2.1.4.3 Antal bestämningar

Om man efter en första bestämning, som utförts i enlighet med det relevanta undersökningsprotokollet (diagram 1 eller diagram 2), inte kan påvisa några animaliska partiklar av en viss typ (dvs. landdjur eller fisk) behövs ingen ytterligare bestämning och analysresultatet ska rapporteras med användning av ordalydelsen i punkt 2.1.5.1.

Om man efter en första bestämning, som utförts i enlighet med det relevanta undersökningsprotokollet (diagram 1 eller diagram 2), kan påvisa totalt 1–5 animaliska partiklar av en viss typ (dvs. landdjur eller fisk) ska en andra bestämning utföras med ett nytt analysprov på 50 g. Om man efter denna andra bestämning kan påvisa 0–5 animaliska partiklar av en viss typ ska analysresultatet rapporteras med användning av ordalydelsen i punkt 2.1.5.2, annars ska en tredje bestämning utföras med ett nytt analysprov på 50 g. Om summan av de partiklar av en viss typ som påvisats efter den första och andra bestämningen likväl överstiger 15 behövs ingen ytterligare bestämning och analysresultatet ska rapporteras direkt med användning av ordalydelsen i punkt 2.1.5.3. Om summan av de animaliska partiklarna av en viss typ som påvisats efter tre bestämningar överstiger 15 ska analysresultatet rapporteras med användning av ordalydelsen i punkt 2.1.5.3. I annat fall ska analysresultatet rapporteras med användning av ordalydelsen i punkt 2.1.5.2.

Om man efter en första bestämning, som utförts i enlighet med det relevanta undersökningsprotokollet (diagram 1 eller diagram 2), kan påvisa fler än fem animaliska partiklar av en viss typ (dvs. landdjur eller fisk) ska analysresultatet rapporteras med användning av ordalydelsen i punkt 2.1.5.3.

2.1.5 Redovisning av resultaten

Vid rapportering av resultaten ska laboratoriet ange på vilken typ av material analysen har gjorts (sediment, flotat eller råvara) och hur många bestämningar som utförts.

Laboratorierapporten ska åtminstone innehålla uppgifter om huruvida beståndsdelar från landdjur och fisk förekommer.

De olika fallen ska rapporteras enligt följande:

2.1.5.1 Inga animaliska partiklar av en viss typ har påvisats

— I det inlämnade provet har inga partiklar från landdjur kunnat påvisas med ljusmikroskop.

— I det inlämnade provet har inga partiklar från fisk kunnat påvisas med ljusmikroskop.

2.1.5.2 I genomsnitt har 1–5 animaliska partiklar av en viss typ påvisats

— I det inlämnade provet har i genomsnitt högst fem partiklar från landdjur kunnat påvisas per bestämning med ljusmikroskop. Partiklarna har identifierats som ... [ben, brosk, muskelvävnad, hår, horn ...]. Antalet partiklar som påvisats är så lågt att det ligger under den mikroskopiska metodens detektionsgräns, vilket innebär att risken för falskt positiva resultat inte kan uteslutas.

Eller i förekommande fall:

— I det inlämnade provet har i genomsnitt högst fem partiklar från fisk kunnat påvisas per bestämning med ljusmikroskop. Partiklarna har identifierats som ... [fiskben, fiskfjäll, brosk, muskelvävnad, otolit, gäl ...]. Antalet partiklar som påvisats är så lågt att det ligger under den mikroskopiska metodens detektionsgräns, vilket innebär att risken för falskt positiva resultat inte kan uteslutas.

Om provet har siktats före beredningen ska det i laboratorierapporten anges i vilken fraktion (siktad fraktion, pellerad fraktion eller palmkärnor) de animaliska partiklarna har påvisats. Om animaliska partiklar endast påvisas i den siktade fraktionen kan det tyda på en förorening från omgivningen.

2.1.5.3 I genomsnitt har fler än fem animaliska partiklar av en viss typ påvisats

— I det inlämnade provet har i genomsnitt fler än fem partiklar från landdjur kunnat påvisas per bestämning med ljusmikroskop. Partiklarna har identifierats som ... [ben, brosk, muskelvävnad, hår, horn ...].

Eller i förekommande fall:

— I det inlämnade provet har i genomsnitt fler än fem partiklar från fisk kunnat påvisas per bestämning med ljusmikroskop. Partiklarna har identifierats som ... [fiskben, fiskfjäll, brosk, muskelvävnad, otolit, gäl ...].

Om provet har siktats före beredningen ska det i laboratorierapporten anges i vilken fraktion (siktad fraktion, pelleterad fraktion eller palmkärnor) de animaliska partiklarna har påvisats. Om animaliska partiklar endast påvisas i den siktade fraktionen kan det tyda på en förorening från omgivningen.

2.2 PCR

2.2.1 Princip

Deoxiribonukleinsyrafragment (DNA-fragment) av animaliskt ursprung som kan förekomma i foderråvaror och foderblandningar påvisas med en genetisk amplifieringsteknik (PCR) som inriktas på artspecifika DNA-sekvenser.

För PCR krävs först en DNA-extraktion. Därefter amplifieras det erhållna DNA-extraktet för att påvisa de djurarter som metoden omfattar.

2.2.2 Reagens och utrustning

2.2.2.1 Reagens

2.2.2.1.1 Reagens för DNA-extraktion

Endast reagens som godkänns av EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder och som offentliggörs på dess webbplats får användas.

2.2.2.1.2 Reagens för genetisk amplifiering

2.2.2.1.2.1 Primrar och prober

Endast primrar och prober med oligonukleotidsekvenser som validerats av EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder får användas ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2 Mastermix

Endast mastermixlösningar som inte innehåller reagens som kan ge falska resultat på grund av att animaliskt DNA förekommer får användas ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3 Reagens för dekontaminering

2.2.2.1.2.3.1 Saltsyrelösning (0,1 N).

2.2.2.1.2.3.2 Blekmedel (natriumhypokloritlösning med 0,15 % aktivt klor).

2.2.2.1.2.3.3 Icke-frätande reagens för dekontaminering av dyr utrustning såsom analysvågar (t.ex. DNA Erase™ från MP Biomedicals).

2.2.2.2 Utrustning

2.2.2.2.1 Analysvåg med en noggrannhet av 0,001 g.

2.2.2.2.2 Utrustning för malning.

2.2.2.2.3 Termocykler för realtids-PCR.

2.2.2.2.4 Mikrocentrifug för mikrocentrifugrör.

2.2.2.2.5 Uppsättning mikropipetter som täcker volymintervallet 1–1 000 µl.

2.2.2.2.6 Molekylärbalogiska plastartiklar av standardtyp: mikrocentrifugrör, pipettspetsar med filter för mikropipetter och plattor som passar termocyklern.

2.2.2.2.7 Frysar för att lagra prov och reagens.

⁽¹⁾ Förteckningen över de primrar och prober för varje djurart som metoden omfattar finns på webbplatsen för EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder.

⁽²⁾ Exempel på funktionella mastermixar finns på webbplatsen för EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder.

2.2.3 *Provtagning och provberedning*

2.2.3.1 *Provtagning*

Ett representativt prov som tagits i enlighet med bestämmelserna i bilaga I ska användas.

2.2.3.2 *Provberedning*

Beredningen av laboratorieprov ska fram till DNA-extraktionen uppfylla kraven i bilaga II. Minst 50 g av provet ska delas upp i analysprov och därefter malas.

Provberedningen ska i enlighet med ISO 24276 utföras i ett annat rum än det som används för DNA-extraktion och genetisk amplifiering.

Två prov på minst 100 mg vardera ska beredas.

2.2.4 *DNA-extraktion*

DNA ska extraheras ur varje berett prov enligt de standardrutiner som fastställs av EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder och som offentliggörs på dess webbplats.

För varje extraktionsserie ska följande två extraktionskontroller beredas i enlighet med ISO 24276:

- Ett blankprov.
- En positiv extraktionskontroll för DNA.

2.2.5 *Genetisk amplifiering*

Den genetiska amplifieringen ska utföras enligt de metoder som validerats för varje art som behöver identifieras. Dessa metoder anges i de standardrutiner som fastställs av EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder och som offentliggörs på dess webbplats. Varje DNA-extrakt ska analyseras vid minst två olika koncentrationer för att bedöma inhibering.

För varje målart ska följande två amplifieringskontroller beredas i enlighet med ISO 24276:

- En positiv kontroll för mål-DNA ska användas för varje platta eller serie av PCR-analyser.
- En reagenskontroll för amplifieringen (även kallad reagenskontroll utan templat [*no template control*]) ska användas för varje platta eller serie av PCR-analyser.

2.2.6 *Tolkning och redovisning av resultat*

Vid rapportering av resultaten ska laboratoriet åtminstone ange provens vikt, vilken extraktionsmetod som använts, antalet bestämningar som utförts och metodens detektionsgräns.

Resultaten ska inte tolkas och rapporteras om den positiva extraktionskontrollen för DNA och de positiva kontrollerna för mål-DNA inte ger positiva resultat för den berörda analysen och om reagenskontrollen för amplifikationen samtidigt är negativ.

Om resultaten från de två proven inte överensstämmer ska åtminstone den genetiska amplifieringen upprepas. Om laboratoriet misstänker att orsaken till den bristande överensstämmelsen kan vara DNA-extraktion, ska en ny DNA-extraktion och genetisk amplifiering utföras innan resultaten tolkas.

Den slutliga redovisningen av resultaten ska grundas på en kombination och tolkning av resultaten från de två proven i enlighet med de standardrutiner som fastställs av EU:s referenslaboratorium för animaliska proteiner i foder och som offentliggörs på dess webbplats.

2.2.6.1 *Negativt resultat*

Ett negativt resultat ska rapporteras enligt följande:

I det inlämnade provet har inget DNA från X påvisats (där X är djurarten eller gruppen av djurarter som metoden omfattar).

2.2.6.2 *Positivt resultat*

Ett positivt resultat ska rapporteras enligt följande:

I det inlämnade provet har DNA från X påvisats (där X är djurarten eller gruppen av djurarter som metoden omfattar)."
