

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 51/2013**z dnia 16 stycznia 2013 r.****zmieniające rozporządzenie (WE) nr 152/2009 w odniesieniu do metod analitycznych oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz****(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt⁽¹⁾, w szczególności jego art. 11 ust. 4,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Artykuł 7 ust. 1 rozporządzenia (WE) nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 maja 2001 r. ustanawiającego zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych przenośnych gąbczastych encefalopatii⁽²⁾ stanowi, że zabrania się karmienia przeżuwaczy białkami pochodzenia zwierzęcego. Zakaz ten rozszerza się na zwierzęta inne niż przeżuwacze oraz ogranicza się, w zakresie karmienia tych zwierząt produktami pochodzenia zwierzęcego, zgodnie z załącznikiem IV do tego rozporządzenia.
- (2) Artykuł 11 ust. 1 rozporządzenia (WE) nr 1069/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 21 października 2009 r. określającego przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylającego rozporządzenie (WE) nr 1774/2002⁽³⁾ zabrania skarmiania zwierząt lądowych danego gatunku, innych niż zwierzęta futerkowe, przetworzonym białkiem zwierzęcym, pochodzącym z całych zwierząt lub z części zwierząt tego samego gatunku, jak również skarmiania ryb hodowlanych przetworzonym białkiem zwierzęcym, pochodzącym z całych ryb lub z części ryb tego samego gatunku.
- (3) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej

kontroli pasz⁽⁴⁾ określa w załączniku VI metody analizy dotyczące oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz. Metodą mikroskopową, która jest obecnie jedyną zatwierdzoną metodą wykrywania obecności białek zwierzęcych w paszach, można rozróżnić obecność składników pochodzących ze zwierząt lądowych od obecności składników pochodzących z ryb, ale nie można z wystarczającą dokładnością określić ilości składników zwierzęcych obecnych w paszy i w związku z tym metoda ta nie powinna być wykorzystywana do tego celu.

- (4) Laboratorium referencyjne UE ds. białek zwierzęcych w paszach zatwierdziło nową metodę wykrywania składników zwierzęcych opartą na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Analiza wykonalności, zorganizowana z udziałem krajowych laboratoriów referencyjnych państw członkowskich, wykazała, że nowa metoda jest wystarczająco skuteczna, by ją stosować jako metodę urzędowej kontroli w Unii. Ta nowa metoda jest w stanie wykryć obecność składników pochodzenia zwierzęcego w paszach, a także zidentyfikować pochodzenia gatunkowe tych składników. Stosowanie nowej metody w połączeniu z metodą mikroskopową lub, w stosownych przypadkach, w jej zastępstwie byłoby bardzo pomocne w kontroli właściwej realizacji zakazów paszowych ustanowionych w rozporządzeniach (WE) nr 999/2001 i (WE) nr 1069/2009.
- (5) Należy zatem odpowiednio zastąpić załącznik VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009.
- (6) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt i ani Parlament Europejski, ani Rada nie wyraziły wobec nich sprzeciwu,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

Załącznik VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 zastępuje się tekstem załącznika do niniejszego rozporządzenia.

⁽¹⁾ Dz.U. L 165 z 30.4.2004, s. 1.⁽²⁾ Dz.U. L 147 z 31.5.2001, s. 1.⁽³⁾ Dz.U. L 300 z 14.11.2009, s. 1.⁽⁴⁾ Dz.U. L 54 z 26.2.2009, s. 1.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 16 stycznia 2013 r.

W imieniu Komisji
José Manuel BARROSO
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK

„ZAŁĄCZNIK VI

METODY ANALIZY DOTYCZĄCE OZNACZANIA SKŁADNIKÓW POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO DO CELÓW URZĘDOWEJ KONTROLI PASZ

1. CEL I ZAKRES

Składniki pochodzenia zwierzęcego w paszach oznacza się metodą mikroskopii świetlnej lub łańcuchową reakcją polimerazy (PCR), zgodnie z przepisami określonymi w niniejszym załączniku.

Te dwie metody umożliwiają wykrycie występowania składników pochodzenia zwierzęcego w materiałach paszowych i mieszankach paszowych. Nie umożliwiają one jednak obliczenia ilości takich składników w materiałach paszowych i mieszankach paszowych. W przypadku obu metod granica wykrywalności wynosi poniżej 0,1 % (w/w).

Metoda PCR umożliwia określenie grupy taksonomicznej składników pochodzenia zwierzęcego obecnych w materiałach paszowych i mieszankach paszowych.

Metody te stosuje się do kontroli stosowania zakazów ustanowionych w art. 7 ust. 1 i w załączniku IV do rozporządzenia (WE) nr 999/2001 oraz w art. 11 ust. 1 rozporządzenia (WE) nr 1069/2009.

W zależności od rodzaju badanej paszy metody te mogą być stosowane, w ramach jednego protokołu operacyjnego, samodzielnie albo wspólnie, zgodnie ze standardowymi procedurami operacyjnymi, ustanowionymi przez laboratorium referencyjne UE ds. białek zwierzęcych w paszach (EURL-AP) i opublikowanymi na jego stronie internetowej ⁽¹⁾.

2. METODY

2.1. **Metoda mikroskopii świetlnej**2.1.1. *Zasada*

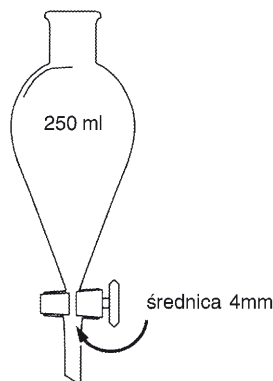
Składniki pochodzenia zwierzęcego, które mogą być obecne w materiałach paszowych i mieszankach paszowych przesłanych do analizy, są identyfikowane na podstawie typowych i mikroskopowo identyfikowalnych cech charakterystycznych, np. włókien mięśniowych i innych cząstek tkanki mięsnej, chrząstki, kości, rogów, włosów, szczeciny, krwi, piór, skorup jaj, ości ryb i łusek.

2.1.2. *Odczynniki i sprzęt*2.1.2.1. *Odczynniki*2.1.2.1.1. *Odczynnik zagęszczający*2.1.2.1.1.1. *Tetrachloroetylen (gęstość 1,62)*2.1.2.1.2. *Odczynnik barwiący*2.1.2.1.2.1. *Roztwór czerwieni alizarynowej (rozcieńczyć 2,5 ml 1 M kwasu chlorowodorowego w 100 ml wody i dodać do tego roztworu 200 mg czerwieni alizarynowej)*2.1.2.1.3. *Środki zamykające*2.1.2.1.3.1. *Ług (NaOH 2,5 %, w/v lub KOH 2,5 %, w/v)*2.1.2.1.3.2. *Glicerol (nierozcieńczony, lepkość: 1 490 cP)*2.1.2.1.3.3. *Norland ® Optical Adhesive 65 (lepkość: 1 200 cP) lub żywica o równoważnych właściwościach do przygotowania trwałych preparatów mikroskopowych*2.1.2.1.4. *Środki zamykające o właściwościach barwiących*2.1.2.1.4.1. *Płyn Lugola (rozpuścić 2 g jodku potasu w 100 ml wody i dodać 1 g jodu, często wstrząsając)*

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2. Odczynnik cystynowy (2 g octanu ołowiu, 10 g NaOH/100 ml wody)
- 2.1.2.1.4.3. Odczynnik Fehlinga (sporządzony przed użyciem z równych części (1/1) roztworów podstawowych A i B. Roztwór A: rozpuścić 6,9 g pentahydratu siarczanu miedzi(II) w 100 ml wody. Roztwór B: rozpuścić 34,6 g tetrahydratu winianu potasowo-sodowego i 12 g NaOH w 100 ml wody)
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametylobenzydyna/nadtlenek wodoru. (rozpuścić 1 g 3,3',5,5' tetrametylobenzydyny (TMB) w 100 ml kwasu octowego lodowatego i 150 ml wody. Przed użyciem zmieszać 4 części tego roztworu TMB z 1 częścią 3 % nadtlenku wodoru)
- 2.1.2.1.5. Odczynniki chemiczne do płukania
- 2.1.2.1.5.1. Etanol \geq 96 % (techniczny)
- 2.1.2.1.5.2. Aceton (techniczny)
- 2.1.2.1.6. Odczynnik bielący
- 2.1.2.1.6.1. Handlowy roztwór podchlorynu sodowego (9–14 % aktywnego chloru)
- 2.1.2.2. Sprzęt
- 2.1.2.2.1. Waga analityczna ważąca z dokładnością do 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Sprzęt do rozdrabniania: młynek lub moździerz
- 2.1.2.2.3. Sita o kwadratowych oczkach 0,25 mm i szerokości 1 mm
- 2.1.2.2.4. Szklany stożkowy rozdzielacz o pojemności 250 ml z kranem z teflonu lub szkła szlifowanego u podstawy stożka. Średnica otworu kranu musi wynosić \geq 4 mm. Alternatywnie można użyć zlewki osadowej ze stożkowym dnem, pod warunkiem że laboratorium wykazało, iż poziomy wykrywalności są równoważne z poziomami uzyskanymi przy użyciu szklanego rozdzielacza.

Rozdzielacz



- 2.1.2.2.5. Mikroskop stereoskopowy umożliwiający powiększenie końcowe w zakresie co najmniej 6,5×–40×
- 2.1.2.2.6. Mikroskop złożony, z jasnym polem widzenia, umożliwiający powiększenie końcowe w zakresie co najmniej 100×–400×. Dodatkowo można wykorzystać światło spolaryzowane i kontrast interferencyjno-różniczkowy
- 2.1.2.2.7. Standardowe szkło laboratoryjne
- 2.1.2.2.8. Sprzęt do przygotowania preparatów mikroskopowych: podstawowe szkiełka mikroskopowe, szkiełka podstawowe z wgłębieniem, szkiełka nakrywkowe (20 × 20 mm), pincety, cienka łopatką
- 2.1.3. *Pobieranie i przygotowywanie próbek*
- 2.1.3.1. Pobieranie próbek
- Należy użyć reprezentatywnej próbki, pobranej zgodnie z przepisami określonymi w załączniku I.

2.1.3.2. Niezbędne środki ostrożności

W celu uniknięcia w laboratorium zanieczyszczenia krzyżowego wszelki sprzęt wielokrotnego użytku należy starannie czyścić przed użyciem. Części rozdzielacza muszą być demontowane przed czyszczeniem. Części rozdzielacza oraz szkło laboratoryjne należy wstępnie wymyć ręcznie, a następnie wymyć w zmywarce. Sita czyści się z użyciem szczotki o twardym syntetycznym włosiu. Po przesianiu substancji tłuszczowej, np. mączki rybnej, zaleca się ostateczne czyszczenie sit acetonem i sprężonym powietrzem.

2.1.3.3. Przygotowanie próbek innych niż tłuszczu lub oleju

2.1.3.3.1. Suszenie próbek: próbki o wilgotności > 14 % muszą być przed obróbką wysuszone.

2.1.3.3.2. Wstępny przesiew próbek: zaleca się wstępne przesianie pasz granulowanych i ziarnistych przez sito o oczkach 1 mm, a następnie przygotowanie i analizę dwóch uzyskanych frakcji traktowanych jako odrębne próbki.

2.1.3.3.3. Pobieranie podpróbek i rozdrabnianie: z co najmniej 50 g próbki należy utworzyć podpróbę do analizy, a następnie rozdrobnić.

2.1.3.3.4. Ekstrakcja i przygotowanie osadu: porcję rozdrobnionej podpróbki o masie 10 g (z dokładnością do 0,01 g) umieszcza się w rozdzielaczu lub zlewce osadowej ze stożkowym dnem i dodaje się 50 ml tetrachloroetylenu. Porcję umieszczoną w rozdzielaczu ogranicza się do 3 g w przypadku mączki rybnej lub innych czystych produktów zwierzęcych, składników mineralnych lub premiksów, które wytwarzają więcej niż 10 % osadu. Mieszaninę należy wstrząsać energicznie przez co najmniej 30 s i ostrożnie dodać do ścianek zlewki kolejne 50 ml tetrachloroetylenu, zmywając wewnętrzną powierzchnię rozdzielacza, aby usunąć wszelkie przylegające cząstki. Otrzymaną mieszaninę należy pozostawić na co najmniej 5 minut przed oddzieleniem osadu poprzez otwarcie kranu.

W przypadku użycia zlewki osadowej ze stożkowym dnem mieszaninę należy energicznie mieszać przez co najmniej 15 sekund, a wszelkie cząstki przylegające do ścianek zlewki należy ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując co najmniej 10 ml czystego tetrachloroetylenu. Mieszaninę należy pozostawić na 3 minuty, a następnie mieszać ponownie przez 15 sekund, a wszelkie cząstki przylegające do ścianek zlewki należy ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując co najmniej 10 ml czystego tetrachloroetylenu. Otrzymaną mieszaninę należy pozostawić na co najmniej 5 minut, a następnie usunąć płynną frakcję poprzez staranną dekantację, przy czym należy uważać, aby nie utracić części osadu.

Osad należy osuszyć, a następnie zważyć (z dokładnością do 0,001 g). Jeżeli więcej niż 5 % osadu stanowią cząstki > 0,50 mm, należy go przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje.

2.1.3.3.5. Ekstrakcja i przygotowanie flotatu: po odzyskaniu osadu metodą opisaną powyżej, w rozdzielaczu powinny pozostać dwie fazy: faza płynna składająca się z tetrachloroetylenu oraz faza stała utworzona z materiału flotacyjnego. Ta faza stała jest flotatem i należy ją odzyskać poprzez całkowite odlanie tetrachloroetylenu z rozdzielacza przez otwarcie kranu. Poprzez odwrócenie rozdzielacza flotat przenosi się na dużą płytkę Petriego i suszy powietrzem w okapie wyciągowym. Jeżeli więcej niż 5 % flotatu stanowią cząstki > 0,50 mm, należy go przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje.

2.1.3.3.6. Przygotowanie surowca: należy przygotować co najmniej 5 g porcję rozdrobnionej podpróbki. Jeżeli więcej niż 5 % materiału stanowią cząstki > 0,50 mm, należy go przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje.

2.1.3.4. Przygotowanie próbek składających się z tłuszczu lub oleju

Do przygotowania próbek składających się z tłuszczu lub oleju stosuje się następujący protokół:

- jeżeli tłuszcz znajduje się w stanie stałym, należy go ogrzewać w suszarce aż do uzyskania postaci płynnej,
- pipetą przenieść 40 ml tłuszczu lub oleju z dna próbki do probówki wirówkowej,
- wirować przez 10 minut przy 4 000 obr./min,
- jeżeli tłuszcz jest zestalony po odwirowaniu, należy go ogrzewać w suszarce aż do uzyskania postaci płynnej,
- ponownie wirować przez 5 minut przy 4 000 obr./min,

- małą łyżką lub łopatką laboratoryjną przenieść połowę zdekantowanych zanieczyszczeń na szkiełka mikroskopowe w celu zbadania; jako środek zamykający zaleca się glicerynę,
- pozostałe zanieczyszczenia wykorzystuje się do przygotowania osadu w sposób opisany w pkt 2.1.3.3.

2.1.3.5. Stosowanie odczynników barwiących

W celu ułatwienia poprawnej identyfikacji składników pochodzenia zwierzęcego, podczas przygotowania próbki laborant może używać odczynników barwiących zgodnie z wytycznymi wydanymi przez EURL-AP i opublikowanymi na jego stronie internetowej.

W przypadku użycia do barwienia osadu roztworu czerwieni alizarynowej stosuje się następujący protokół:

- wysuszony osad przenieść do szklanej próbki i dwukrotnie przepłukać stosując około 5 ml etanolu (za każdym razem stosować wstrząsarkę przez 30 s, rozpuszczalnik pozostawić na około 1 min 30 s do osadzenia i następnie go odlać,
- osad wybielić przez dodanie co najmniej 1 ml roztworu podchlorynu sodowego. Pozwolić na przebieg reakcji przez 10 minut. Probówkę napełnić wodą, osad musi osadzać się od 2 do 3 minut, a wodę z zawieszonymi cząstkami delikatnie odlać,
- osad przepłukać jeszcze dwukrotnie około 10 ml wody (za każdym razem stosować wstrząsarkę przez 30 s, pozostawić do osadzenia i odlać wodę),
- dodać 2 do 10 kropli roztworu czerwieni alizarynowej, a następnie mieszaninę wymieszać wstrząsarką. Pozwolić na przebieg reakcji przez 30 s i dwukrotnie przepłukać zabarwiony osad stosując około 5 ml etanolu, a następnie przepłukać go raz acetonem (za każdym razem stosować wstrząsarkę przez 30 s, rozpuszczalnik pozostawić na około 1 min do osadzenia i następnie go odlać),
- zabarwiony osad należy osuszyć.

2.1.4. Badanie mikroskopowe

2.1.4.1. Przygotowanie preparatów

Preparaty mikroskopowe przygotowuje się z osadu i, w zależności od wyboru laboranta, z flotatu albo z surowca. Jeśli podczas przygotowania próbki zastosowano przesiewanie, należy przygotować dwie uzyskane frakcje (drobną i gruboziarnistą). Naważki z frakcji rozprowadzone w preparatach muszą być reprezentatywne dla całej frakcji.

Należy przygotować wystarczającą liczbę preparatów w celu zapewnienia pełnej realizacji protokołu badawczego określonego w pkt 2.1.4.2.

Preparaty mikroskopowe montuje się przy użyciu odpowiedniego środka zamykającego zgodnie ze standardową procedurą operacyjną ustaloną przez EURL-AP i opublikowaną na jego stronie internetowej. Preparaty należy przykryć szkiełkami nakrywkowymi.

2.1.4.2. Protokoły obserwacji w celu wykrycia cząstek zwierzęcych w mieszkach paszowych i materiałach paszowych

Preparaty mikroskopowe bada się zgodnie z protokołami obserwacji określonymi na schemacie 1 dla mieszanek paszowych i materiałów paszowych innych niż czysta mączka rybna lub na wykresie 2 dla czystej mączki rybnej.

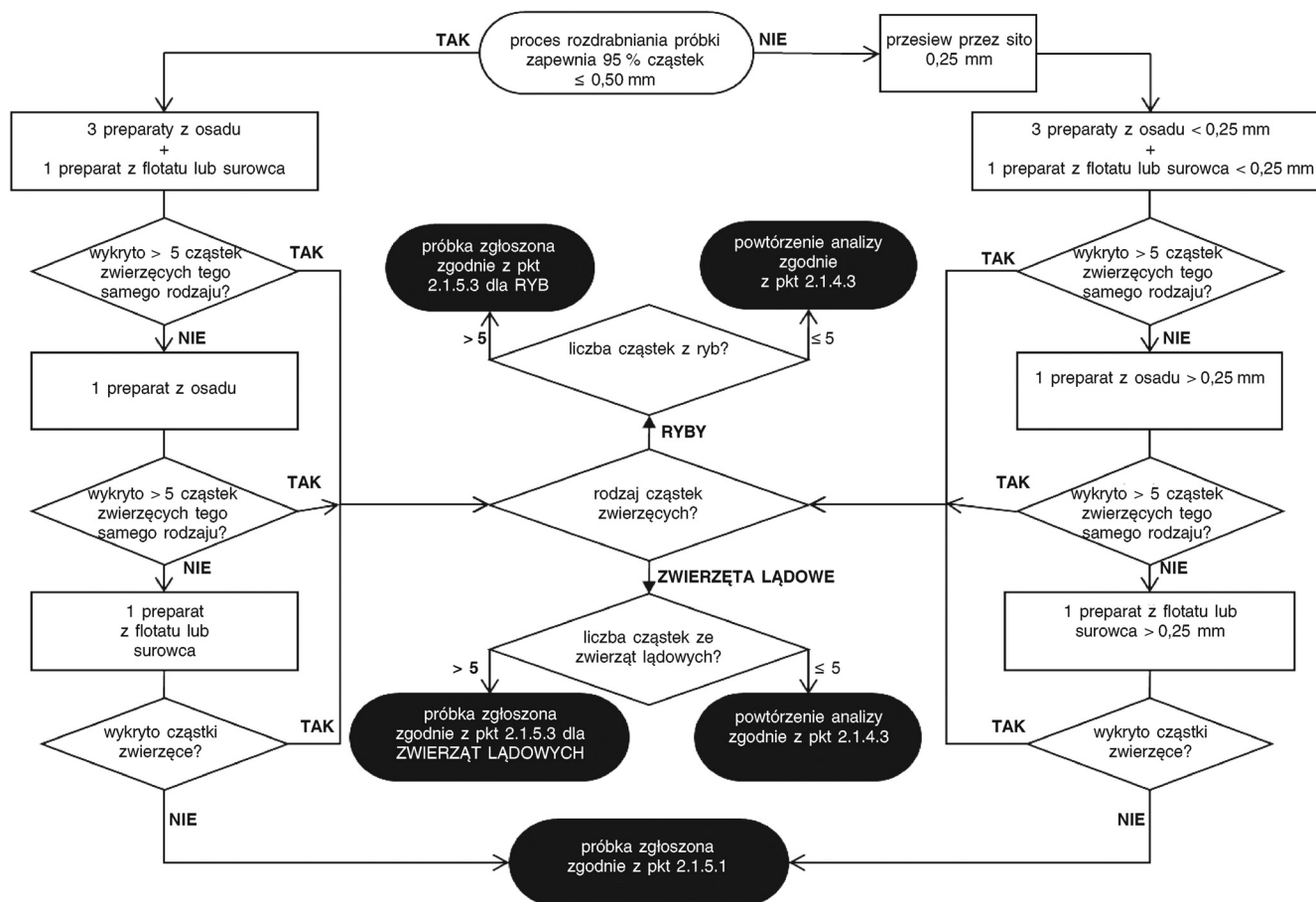
Przy użyciu mikroskopu złożonego przeprowadza się obserwację mikroskopową osadu i, w zależności od wyboru laboranta, flotatu lub surowca. W przypadku frakcji gruboziarnistych poza mikroskopem złożonym można dodatkowo użyć mikroskopu stereoskopowego. Każdy preparat należy obserwować w całości stosując różne powiększenia.

Należy ściśle przestrzegać minimalnej liczby preparatów jakie zgodnie z protokołem obserwacji należy obserwować na każdym etapie, chyba że cały podzielony na frakcje materiał nie pozwala osiągnąć wymaganej liczby preparatów. Nie można obserwować więcej niż 6 preparatów na jedno oznaczenie.

W celu ułatwienia identyfikacji rodzaju oraz pochodzenia cząstek, laborant może wykorzystać narzędzia pomocnicze, takie jak systemy wspomagające podejmowanie decyzji, biblioteki obrazów oraz próbki referencyjne.

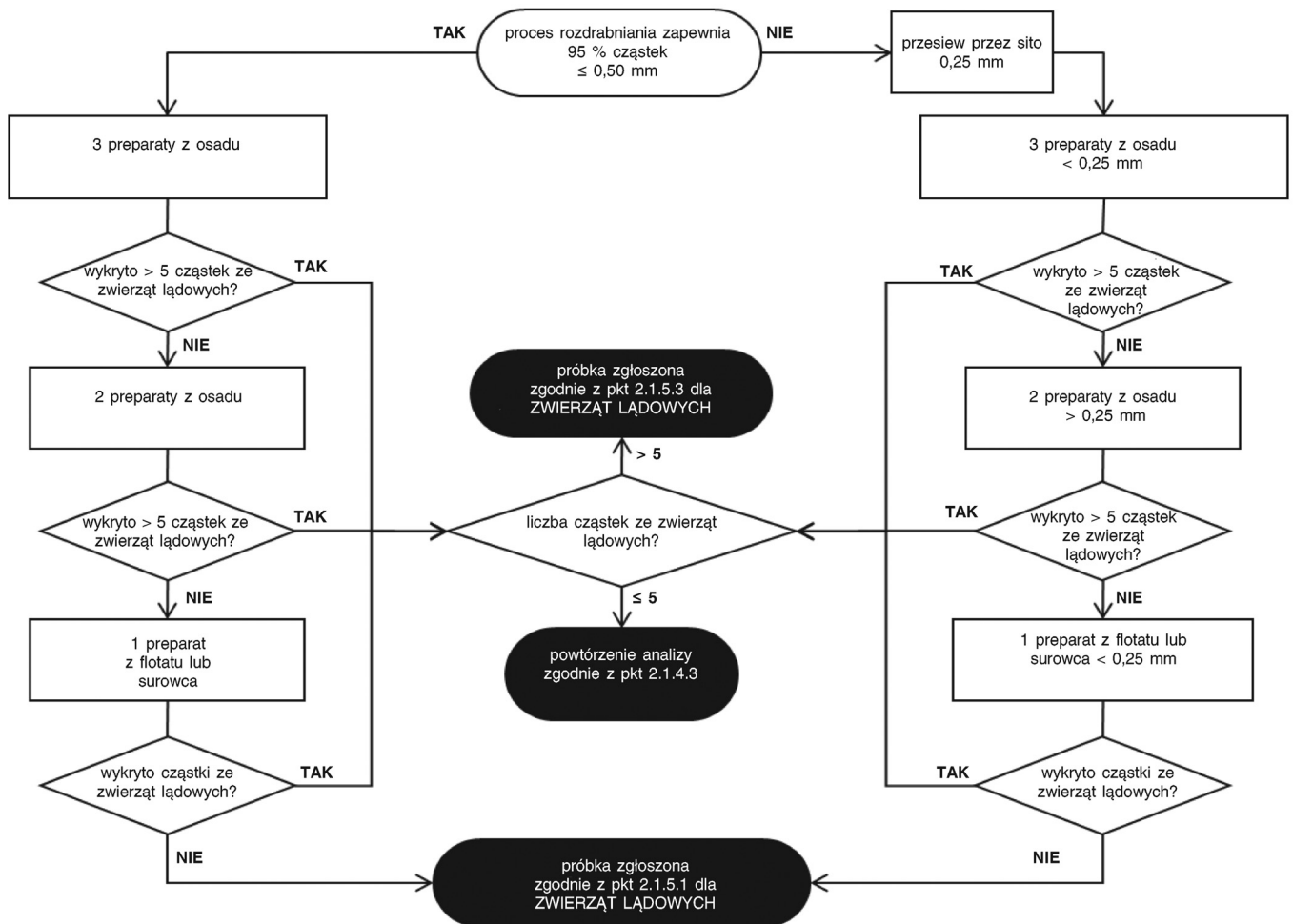
Schemat 1

Protokół obserwacji w celu wykrycia cząstek zwierzęcych w mieszankach paszowych i materiałach paszowych innych niż mączka rybna



Schemat 2

Protokół obserwacji w celu wykrycia cząstek zwierzęcych w mące rybnej



2.1.4.3. Liczba oznaczeń

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia wykonanego zgodnie z protokołem obserwacji przedstawionym na schemacie 1 lub w stosownym przypadku na schemacie 2 nie wykryto żadnej cząstki zwierzęcej danego rodzaju (tj. zwierzęcia lądowego lub ryby), dodatkowe oznaczenie nie jest konieczne, a wynik analizy przekazuje się stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.1.

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia wykonanego zgodnie z protokołem obserwacji przedstawionym na schemacie 1 lub w stosownym przypadku na schemacie 2, łączna liczba wykrytych cząstek zwierzęcych danego rodzaju (tj. zwierzęcia lądowego lub ryby) wynosi od 1 do 5, wykonuje się drugie oznaczenie przy użyciu nowej 50 g podpróbki. Jeśli w wyniku tego drugiego oznaczenia liczba wykrytych cząstek zwierzęcych danego rodzaju wynosi od 0 do 5, wynik analizy przekazuje się stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.2 i wykonuje się trzecie oznaczenie przy użyciu nowej 50 g podpróbki. Niemniej jednak, jeżeli w wyniku pierwszego i drugiego oznaczenia suma cząstek danego rodzaju wykrytych podczas dwóch oznaczeń jest wyższa niż 15, dodatkowe oznaczenie nie jest konieczne, a wynik analizy przekazuje się bezpośrednio, stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.3. Jeżeli w wyniku trzeciego oznaczenia suma cząstek zwierzęcych danego rodzaju wykrytych podczas trzech oznaczeń jest wyższa niż 15, wynik analizy przekazuje się, stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.3. W przeciwnym wypadku wynik analizy przekazuje się, stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.2.

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia wykonanego zgodnie z protokołem obserwacji przedstawionym na schemacie 1 lub w stosownym przypadku na schemacie 2, wykryto ponad 5 cząstek zwierzęcych danego rodzaju (tj. zwierzęcia lądowego lub ryby), wynik analizy przekazuje się stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.3.

2.1.5. Przedstawianie wyników

Przekazując wyniki laboratorium musi podać jakiego typu materiał poddano analizie (osad, flotat czy surowiec) oraz liczbę wykonanych oznaczeń.

Sprawozdanie laboratoryjne musi zawierać co najmniej informacje o występowaniu składników pochodzenia zwierzęcego ze zwierząt lądowych i z ryb.

Sprawozdania dotyczące poszczególnych przypadków należy składać w następujący sposób.

2.1.5.1. Nie wykryto żadnych cząstek zwierzęcych danego rodzaju:

— używając mikroskopu optycznego w badanej próbce nie wykryto żadnych cząstek pochodzących ze zwierząt lądowych,

— używając mikroskopu optycznego w badanej próbce nie wykryto żadnych cząstek pochodzących z ryb,

2.1.5.2. Wykryto średnio od 1 do 5 cząstek zwierzęcych danego rodzaju:

— używając mikroskopu optycznego w badanej próbce wykryto średnio na oznaczenie nie więcej niż 5 cząstek pochodzących ze zwierząt lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi ...]. Ta niewielka obecność – poniżej granicy wykrywalności metody mikroskopowej – oznacza, że nie można wykluczyć ryzyka wyniku fałszywie dodatniego.

Lub, w stosownych przypadkach,

— używając mikroskopu optycznego w badanej próbce wykryto średnio na oznaczenie nie więcej niż 5 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolit, skrzelka ...]. Ta niewielka obecność – poniżej granicy wykrywalności metody mikroskopowej – oznacza, że nie można wykluczyć ryzyka wyniku fałszywie dodatniego.

W przypadku wstępnego przesiewu próbki, sprawozdanie laboratoryjne musi określić w jakiej frakcji (sitowej, granulowanej czy ziarnistej) wykryto cząstki zwierzęce, ponieważ wykrycie cząstek zwierzęcych tylko we frakcji sitowej może wynikać z zanieczyszczenia środowiskowego.

2.1.5.3. Wykryto średnio ponad 5 cząstek zwierzęcych danego rodzaju

— używając mikroskopu optycznego w badanej próbce wykryto średnio na oznaczenie ponad 5 cząstek pochodzących ze zwierząt lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi ...].

Lub, w stosownych przypadkach,

— używając mikroskopu optycznego w badanej próbce wykryto średnio na oznaczenie ponad 5 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolit, skrzelka ...].

W przypadku wstępnego przesiewu próbki, sprawozdanie laboratoryjne musi określić w jakiej frakcji (sitowej, granulowanej czy ziarnistej) wykryto cząstki zwierzęce, ponieważ wykrycie cząstek zwierzęcych tylko we frakcji sitowej może wynikać z zanieczyszczenia środowiskowego.

2.2. PCR

2.2.1. Zasada

Fragmenty kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) pochodzenia zwierzęcego, które mogą się znajdować w materiałach paszowych i mieszkach paszowych, wykrywa się techniką amplifikacji genów stosując metodę PCR skierowaną na sekwencje DNA charakterystyczne dla określonych gatunków.

Metoda PCR wymaga w pierwszej kolejności etapu ekstrakcji DNA. Otrzymany w ten sposób ekstrakt DNA poddaje się później amplifikacji w celu wykrycia gatunków zwierząt uwzględnianych w badaniu.

2.2.2. Odczynniki i sprzęt

2.2.2.1. Odczynniki

2.2.2.1.1. Odczynniki stosowane na etapie ekstrakcji DNA

Można stosować wyłącznie odczynniki zatwierdzone przez EURL-AP i wymienione na jego stronie internetowej.

2.2.2.1.2. Odczynniki stosowane na etapie amplifikacji genów

2.2.2.1.2.1. Startery i sondy

Można stosować wyłącznie startery i sondy z sekwencjami oligonukleotydów zatwierdzone przez EURL-AP ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Master Mix

Można stosować wyłącznie roztwory Master Mix niezawierające odczynników, które mogłyby prowadzić do fałszywych wyników z uwagi na obecność DNA zwierzęcego ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Odczynniki odkażające

2.2.2.1.2.3.1. Roztwór kwasu chlorowodorowego (0,1 N).

2.2.2.1.2.3.2. Środek bielący (roztwór podchlorynu sodowego zawierający 0,15 % aktywnego chloru)

2.2.2.1.2.3.3. Odczynniki niewykazujące działania żrącego do odkażania kosztownych urządzeń, takich jak wagi analityczne (np. DNA EraseTM produkowany przez MP Biomedicals)

2.2.2.2. Sprzęt

2.2.2.2.1. Waga analityczna ważąca z dokładnością do 0,001 g

2.2.2.2.2. Sprzęt do rozdrabniania

2.2.2.2.3. Termocykler do przeprowadzania PCR w czasie rzeczywistym,

2.2.2.2.4. Mikrowirówka do mikropróbek

2.2.2.2.5. Zestaw mikropipet umożliwiających odmierzanie od 1 µl do 1 000 µl

2.2.2.2.6. Standardowe wyroby z tworzywa sztucznego stosowane w laboratorium biologii molekularnej: mikropróbki, końcówki z tworzywa sztucznego do mikropipet, z filtrem, płytki nadające się do termocyklera.

2.2.2.2.7. Zamrażarki do przechowywania próbek i odczynników

⁽¹⁾ Wykaz tych starterów i sond dla każdego gatunku zwierząt uwzględnianego w badaniu jest dostępny na stronie internetowej EURL-AP.

⁽²⁾ Przykłady odpowiednich roztworów Master Mix są dostępne na stronie internetowej EURL-AP.

- 2.2.3. *Pobieranie i przygotowywanie próbek*
- 2.2.3.1. *Pobieranie próbek*
Należy użyć reprezentatywnej próbki, pobranej zgodnie z przepisami określonymi w załączniku I.
- 2.2.3.2. *Przygotowanie próbek*
Przygotowanie próbek laboratoryjnych do ekstrakcji DNA musi być zgodne z wymaganiami określonymi w załączniku II. Z co najmniej 50 g próbki należy utworzyć podpróbkę do analizy, a następnie rozdrobnić.
Próbki przygotowuje się w pomieszczeniu innym niż przeznaczone do ekstrakcji DNA i reakcji amplifikacji genów zgodnie z opisem w normie ISO 24276.
Należy przygotować dwie naważki o wadze co najmniej 100 mg każda.
- 2.2.4. *Ekstrakcja DNA*
Ekstrakcję DNA przeprowadza się dla każdej naważki zgodnie ze standardową procedurą operacyjną ustaloną przez EURL-AP i opublikowaną na jego stronie internetowej.
Dla każdej serii ekstrakcji należy przygotować dwa kontrolne roztwory ekstrakcyjne zgodnie z opisem w normie ISO 24276.
— ślepy roztwór ekstrakcyjny,
— dodatni kontrolny roztwór ekstrakcyjny DNA.
- 2.2.5. *Amplifikacja genów*
Amplifikację genów przeprowadza się przy użyciu metod zatwierdzonych dla każdego gatunku wymagającego identyfikacji. Metody te określono w standardowej procedurze operacyjnej ustalonej przez EURL-AP i opublikowanej na jego stronie internetowej. Każdy ekstrakt DNA powinien być analizowany w dwóch różnych rozcieńczeniach w celu oceny inhibicji.
Dwa kontrolne roztwory amplifikacji przygotowuje się dla każdego gatunku docelowego, zgodnie z opisem w normie ISO 24276.
— dodatni kontrolny roztwór docelowego DNA stosuje się dla każdej płytki lub serii badań PCR,
— kontrolny roztwór odczynnika do amplifikacji (tzw. kontrola negatywna reakcji) stosuje się dla każdej płytki lub serii badań PCR.
- 2.2.6. *Interpretacja i przedstawianie wyników*
Przekazując wyniki laboratorium musi podać co najmniej wagę użytych naważek, zastosowaną metodę ekstrakcji, liczbę wykonanych oznaczeń oraz granicę wykrywalności metody.
Wyniki nie mogą być interpretowane i przekazywane jeżeli dodatni kontrolny roztwór ekstrakcyjny DNA i dodatnie kontrolne roztwory docelowego DNA nie dają dodatnich wyników w odniesieniu do badanego celu, podczas gdy kontrolny roztwór odczynnika do amplifikacji jest ujemny.
W przypadku gdy wyniki otrzymane z dwóch naważek nie są zgodne, należy powtórzyć co najmniej etap amplifikacji genów. Jeżeli laboratorium podejrzewa, że powodem niezgodności mogą być ekstrakty DNA, przeprowadza się ponowną ekstrakcję DNA, a przed interpretacją wyników należy przeprowadzić amplifikację genów.
Ostateczne wyrażenie wyników należy oprzeć na integracji i interpretacji wyników otrzymanych z dwóch naważek zgodnie ze standardową procedurą operacyjną ustaloną przez EURL-AP i opublikowaną na jego stronie internetowej.
- 2.2.6.1. *Wynik ujemny*
Wynik ujemny przekazuje się w następujący sposób:
W badanej próbce nie wykryto DNA X (gdzie X oznacza gatunek zwierząt lub grupę gatunków zwierząt, które stanowią przedmiot analizy).
- 2.2.6.2. *Wynik dodatni*
Wynik dodatni przekazuje się w następujący sposób:
W badanej próbce wykryto DNA X (gdzie X oznacza gatunek zwierząt lub grupę gatunków zwierząt, które stanowią przedmiot analizy)."