

## ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 51/2013 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 16ης Ιανουαρίου 2013

για τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 152/2009 όσον αφορά τις μεθόδους ανάλυσης για τον προσδιορισμό των συστατικών ζωικής προέλευσης με σκοπό τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 882/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, για τη διενέργεια επίσημων ελέγχων της συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και προς τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων <sup>(1)</sup>, και ιδίως το άρθρο 11 παράγραφος 4,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Το άρθρο 7 παράγραφος 1 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 999/2001 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Μαΐου 2001, για τη θέσπιση κανόνων πρόληψης, καταπολέμησης και εξάλειψης ορισμένων μεταδοτικών σπογγωδών εγκεφαλοπαθειών <sup>(2)</sup> προβλέπει ότι στη διατροφή των μηρυκαστικών απαγορεύεται να χρησιμοποιούνται μεταποιημένες πρωτεΐνες που προέρχονται από θηλαστικά. Η συγκεκριμένη απαγόρευση επεκτείνεται σε ζώα εκτός των μηρυκαστικών, με τους περιορισμούς που ορίζονται στο παράρτημα IV του εν λόγω κανονισμού όσον αφορά τη διατροφή αυτών των ζώων με προϊόντα ζωικής προέλευσης.
- (2) Το άρθρο 11 παράγραφος 1 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1069/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 21ης Οκτωβρίου 2009, περί υγειονομικών κανόνων για ζωικά υποπροϊόντα και παράγωγα προϊόντα που δεν προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1774/2002 <sup>(3)</sup> απαγορεύει τη σίτιση χερσαίων ζώων δεδομένου είδους πλην των γουνοφόρων ζώων με μεταποιημένη ζωική πρωτεΐνη που προέρχεται από πτώματα ή μέρη πτωμάτων ζώων του ίδιου είδους, καθώς και τη σίτιση εκτρεφόμενων ψαριών με μεταποιημένη ζωική πρωτεΐνη που προέρχεται από πτώματα ή μέρη πτωμάτων εκτρεφόμενων ψαριών του ίδιου είδους.
- (3) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 152/2009 της Επιτροπής, της 27ης Ιανουαρίου 2009, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωο-

τροφών <sup>(4)</sup> καθορίζει, στο παράρτημα VI, τις μεθόδους ανάλυσης για τον προσδιορισμό των συστατικών ζωικής προέλευσης με σκοπό τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών. Η μικροσκοπική μέθοδος, η οποία συνιστά προς το παρόν τη μόνη επικυρωμένη μέθοδο για την ανίχνευση της παρουσίας ζωικών πρωτεϊνών στις ζωοτροφές, είναι ικανή να διακρίνει την παρουσία συστατικών που προέρχονται από χερσαία ζώα από την παρουσία συστατικών που προέρχονται από ψάρια, αλλά δεν είναι σε θέση να προσδιορίσει με αρκετή ακρίβεια την ποσότητα των ζωικών συστατικών που είναι παρόντα στις ζωοτροφές και, ως εκ τούτου, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον συγκεκριμένο σκοπό.

- (4) Μια νέα μέθοδος ανίχνευσης ζωικών συστατικών που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επικυρώθηκε από το εργαστήριο αναφοράς της ΕΕ για τις ζωικές πρωτεΐνες στις ζωοτροφές. Μελέτη εφαρμογής, που οργανώθηκε σε συνεργασία με τα εθνικά εργαστήρια αναφοράς των κρατών μελών, απέδειξε ότι η νέα μέθοδος είναι αρκετά αξιόπιστη ώστε να χρησιμοποιείται ως επίσημη μέθοδος ελέγχου στην Ένωση. Η νέα μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύει την παρουσία ζωικών συστατικών στις ζωοτροφές και να ταυτοποιεί το είδος από το οποίο προέρχονται αυτά τα συστατικά. Η χρήση αυτής της νέας μεθόδου, σε συνδυασμό ή σε αντικατάσταση, κατά περίπτωση, της μικροσκοπικής μεθόδου θα είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον έλεγχο της ορθής εφαρμογής της απαγόρευσης των ζωοτροφών που προβλέπονται στους κανονισμούς (ΕΚ) αριθ. 999/2001 και (ΕΚ) αριθ. 1069/2009.
- (5) Συνεπώς, το παράρτημα VI του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 152/2009 θα πρέπει να αντικατασταθεί αναλόγως.
- (6) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων και ούτε το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ούτε το Συμβούλιο αντιτάχθηκαν σ' αυτά,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα VI του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 152/2009 αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος του παρόντος κανονισμού.

<sup>(1)</sup> ΕΕ L 165 της 30.4.2004, σ. 1.<sup>(2)</sup> ΕΕ L 147 της 31.5.2001, σ. 1.<sup>(3)</sup> ΕΕ L 300 της 14.11.2009, σ. 1.<sup>(4)</sup> ΕΕ L 54 της 26.2.2009, σ. 1.

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 16 Ιανουαρίου 2013.

Για την Επιτροπή  
Ο Πρόεδρος  
José Manuel BARROSO

---

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## «ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

**ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΟΝ ΕΠΙΣΗΜΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ**

## 1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ

Ο προσδιορισμός των συστατικών ζωικής προέλευσης στις ζωοτροφές πρέπει να διενεργείται με οπτική μικροσκοπία ή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), σύμφωνα με τις διατάξεις που προβλέπονται στο παρόν παράρτημα.

Αυτές οι δύο μέθοδοι καθιστούν εφικτή την ανίχνευση της παρουσίας συστατικών ζωικής προέλευσης σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σύνθετες ζωοτροφές. Ωστόσο, δεν επιτρέπουν τον υπολογισμό της ποσότητας των εν λόγω συστατικών σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σύνθετες ζωοτροφές. Αμφότερες οι μέθοδοι έχουν όριο ανίχνευσης κάτω από 0,1 % (w/w).

Η μέθοδος PCR καθιστά εφικτό τον καθορισμό της ταξινόμησης ομάδας των συστατικών ζωικής προέλευσης που είναι παρόντα σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σύνθετες ζωοτροφές.

Αυτές οι μέθοδοι θα εφαρμόζονται για τον έλεγχο της εφαρμογής των απαγορεύσεων που προβλέπονται στο άρθρο 7 παράγραφος 1 και στο παράρτημα IV του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 999/2001, καθώς και στο άρθρο 11 παράγραφος 1 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1069/2009.

Ανάλογα με το είδος των ζωοτροφών που υποβάλλονται σε δοκιμή, οι εν λόγω μέθοδοι μπορεί να χρησιμοποιούνται —στο πλαίσιο ενός και μόνου πρωτοκόλλου λειτουργίας— είτε χωριστά είτε από κοινού, σύμφωνα με τις τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (SOP) που έχουν καταρτιστεί από το εργαστήριο αναφοράς της ΕΕ για τις ζωικές πρωτεΐνες στις ζωοτροφές (EURL-AP) και έχουν αναρτηθεί στον δικτυακό του τόπο <sup>(1)</sup>.

## 2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. **Οπτική μικροσκοπία**

## 2.1.1. Αρχή

Τα συστατικά ζωικής προέλευσης που μπορεί να είναι παρόντα σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σε σύνθετες ζωοτροφές που αποστέλλονται προς ανάλυση ταυτοποιούνται με βάση τυπικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι ταυτοποιήσιμα με χρήση μικροσκοπίου, όπως μυϊκές ίνες και άλλα σωματίδια κρέατος, χόνδροι, οστά, κέρατα, τρίχες, χνούδι, αίμα, φτερά, κελύφη αυγών, ψαροκόκαλα και λέπια.

## 2.1.2. Αντιδραστήρια και συσκευές

## 2.1.2.1. Αντιδραστήρια

## 2.1.2.1.1. Παράγοντας συμπύκνωσης

## 2.1.2.1.1.1. Τετραχλωροαιθυλένιο (σχετική πυκνότητα 1,62)

## 2.1.2.1.2. Αντιδραστήριο χρώσης

## 2.1.2.1.2.1. Διάλυμα ερυθρού της αλιζαρίνης (Αραιώνονται 2,5 ml υδροχλωρικού οξέος 1M σε 100 ml νερού και στο διάλυμα προστίθενται 200 mg ερυθρού της αλιζαρίνης.)

## 2.1.2.1.3. Μονιμοποιητικά μέσα

## 2.1.2.1.3.1. Αλισίβα (NaOH 2,5 % w/v ή KOH 2,5 % w/v)

## 2.1.2.1.3.2. Γλυκερόλη (χωρίς αραιώση, ιξώδες: 1 490 cP)

## 2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (ιξώδες: 1 200 cP) ή ρητίνη με ισοδύναμες ιδιότητες για μονιμοποίηση στην αντικειμενοφόρο πλάκα

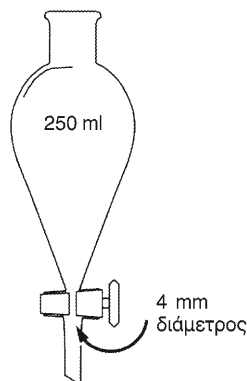
## 2.1.2.1.4. Μονιμοποιητικά μέσα με ιδιότητες χρώσης

## 2.1.2.1.4.1. Διάλυμα Lugol (Αραιώνονται 2 g ιωδιούχου καλίου σε 100 ml νερού και προστίθεται 1 g ιωδίου με συχνή ανακίνηση.)

<sup>(1)</sup> <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2. Αντιδραστήριο κυστίνης (2 g οξικού μολύβδου, 10 g NaOH/100 ml νερού)
- 2.1.2.1.4.3. Αντιδραστήριο Fehling (παρασκευάζεται, για άμεση χρήση, από ίσα μέρη (1/1) δύο αρχικών διαλυμάτων Α και Β. Διάλυμα Α: Αραιώνονται 6,9 g θειικού χαλκού πενταένυδρου σε 100 ml νερού. Διάλυμα Β: Αραιώνονται 34,6 g τρυγού καλίου νατρίου τετραϋδρικού και 12 g NaOH σε 100 ml νερού.)
- 2.1.2.1.4.4. Τετραμεθυλοβενζιδίνη/Υπεροξειδίο του υδρογόνου. (Αραιώνεται 1 g 3,3',5,5' τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB) σε 100 ml κρυσταλλικού οξικού οξέος και 150 ml νερού. Πριν από τη χρήση, αναμειγνύονται 4 μέρη αυτού του διαλύματος TMB με 1 μέρος 3 % υπεροξειδίου του υδρογόνου.)
- 2.1.2.1.5. Παράγοντες έκπλυσης
- 2.1.2.1.5.1. Αιθανόλη  $\geq 96$  % (τεχνικής ποιότητας)
- 2.1.2.1.5.2. Ακετόνη (τεχνικής ποιότητας)
- 2.1.2.1.6. Αντιδραστήριο λεύκανσης
- 2.1.2.1.6.1. Εμπορικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (9-14 % ενεργό χλώριο)
- 2.1.2.2. Εξοπλισμός
- 2.1.2.2.1. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Εξοπλισμός άλεσης: μύλος ή γουδί
- 2.1.2.2.3. Κόσκινο με τετράγωνα διάκενα ανοίγματος 0,25 mm και 1 mm
- 2.1.2.2.4. Γυάλινη κωνική διαχωριστική χοάνη με χωρητικότητα 250 ml και, στη βάση της, στρόφιγγα από Teflon ή εσφυρισμένο γυαλί. Η διάμετρος ανοίγματος της στρόφιγγας θα πρέπει να είναι  $\geq 4$  mm. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποτήρι ζέσεως με κωνικό πυθμένα, με την προϋπόθεση ότι το εργαστήριο έχει αποδείξει ότι τα επίπεδα ανίχνευσης είναι ισοδύναμα με εκείνα που επιτυγχάνονται με τη χρήση γυάλινης κωνικής διαχωριστικής χοάνης.

#### Χοάνη διαχωρισμού



- 2.1.2.2.5. Στερεομικροσκόπιο που καλύπτει τελική κλίμακα μεγέθυνσης από τουλάχιστον 6,5× έως 40×
- 2.1.2.2.6. Σύνθετο μικροσκόπιο που καλύπτει τελική κλίμακα μεγέθυνσης τουλάχιστον 100× έως 400×, με εκπεμπόμενο φως φωτεινού πεδίου. Μπορούν επιπλέον να χρησιμοποιηθούν πολωμένο φως και διαφορική παρεμβαλλόμενη αντίθεση.
- 2.1.2.2.7. Συνήθη εργαστηριακά γυάλινα σκεύη
- 2.1.2.2.8. Εξοπλισμός για προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών: αντικειμενοφόρες πλάκες κλασικού μικροσκοπίου, κοίλες αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες (20×20 mm), λαβίδες και λεπτές σπάτουλες
- 2.1.3. Δειγματοληψία και παρασκευή δείγματος
- 2.1.3.1. Δειγματοληψία
- Θα χρησιμοποιείται αντιπροσωπευτικό δείγμα, που θα λαμβάνεται σύμφωνα με τις διατάξεις που προβλέπονται στο παράρτημα I.

## 2.1.3.2. Απαραίτητες προφυλάξεις

Για την πρόληψη διασταυρούμενης επιμόλυνσης στο εργαστήριο, κάθε επαναχρησιμοποιούμενος εξοπλισμός πρέπει να καθαρίζεται επιμελώς πριν από τη χρήση. Τα εξαρτήματα της διαχωριστικής χοάνης πρέπει να αποσυναρμολογούνται πριν από τον καθαρισμό τους. Τα εξαρτήματα της διαχωριστικής χοάνης και τα γυάλινα σκεύη πρέπει να προπλένονται στο χέρι και μετά να πλένονται σε πλυντήριο. Τα κόσκινα πρέπει να καθαρίζονται με βούρτσα με σκληρές συνθετικές τρίχες. Μετά το κοσκίνισμα λιπαρών υλικών, όπως το ιχθυάλευρο, συνιστάται τελικός καθαρισμός των κοσκίνων με ακετόνη και πεπεσμένο αέρα.

## 2.1.3.3. Παρασκευή δειγμάτων άλλων από λίπη ή έλαια

2.1.3.3.1. Αποξήρανση δειγμάτων: Τα δείγματα με περιεκτικότητα σε υγρασία > 14 % πρέπει να ξηραίνονται προτού χρησιμοποιηθούν.2.1.3.3.2. Προκοσκίνισμα δειγμάτων: Συνιστάται το προκοσκίνισμα σε 1 mm σύμπηκτων ζωοτροφών και κόκκων και, στη συνέχεια, η παρασκευή και ανάλυση των δύο τμημάτων που προκύπτουν ως χωριστών δειγμάτων.2.1.3.3.3. Επιμέρους δειματοληψία και άλεση: Τουλάχιστον 50 g του δείγματος πρέπει να αποτελούν αντικείμενο επιμέρους δειματοληψίας για ανάλυση και μεταγενέστερη άλεση.2.1.3.3.4. Εκχύλιση και προετοιμασία του ιζήματος: Ποσότητα 10 g (ακρίβεια 0,01 g) του αλεσμένου επιμέρους δείγματος μεταφέρεται στη διαχωριστική χοάνη ή στο ποτήρι ζέσεως με κωνικό πυθμένα και προστίθενται 50 ml τετραχλωροαιθυλένιο. Η ποσότητα που μεταφέρεται στη διαχωριστική χοάνη περιορίζεται σε 3 g στην περίπτωση ιχθυαλεύρων ή άλλων καθαρών ζωικών προϊόντων, μεταλλικών συστατικών ή προμειγμάτων που παράγουν ίζημα περισσότερο από 10 %. Το μείγμα ανακινείται έντονα για τουλάχιστον 30 s και προστίθενται προσεκτικά τουλάχιστον 50 ml τετραχλωροαιθυλένιο επιπλέον, ενώ εκπλένεται η εσωτερική επιφάνεια της χοάνης προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν κατάλοιπα. Το μείγμα που προκύπτει αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 5 λεπτά προτού το ίζημα διαχωριστεί πλήρως με το άνοιγμα της στρόφιγγας.

Αν χρησιμοποιείται ποτήρι ζέσεως με κωνικό πυθμένα, το μείγμα αναδεύεται έντονα για τουλάχιστον 15 s, ενώ τυχόν κατάλοιπα που παραμένουν στα τοιχώματα του ποτηριού εκπλένονται προσεκτικά από την εσωτερική επιφάνεια με τουλάχιστον 10 ml καθαρού τετραχλωροαιθυλένιο. Το μείγμα αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 3 λεπτά και στη συνέχεια ανακινείται εκ νέου για 15 δευτερόλεπτα, ενώ τυχόν κατάλοιπα που παραμένουν στα τοιχώματα του ποτηριού εκπλένονται προσεκτικά από την εσωτερική επιφάνεια με τουλάχιστον 10 ml καθαρού τετραχλωροαιθυλένιο. Το μείγμα που προκύπτει αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 5 λεπτά και τότε το υγρό κλάσμα απομακρύνεται και απορρίπτεται με προσεκτική απόχυση, ώστε να μη χαθεί ποσότητα από το ίζημα.

Το ίζημα ξηραίνεται και κατόπιν ζυγίζεται (ακρίβεια 0,001 g). Αν ποσοστό του ιζήματος μεγαλύτερο από 5 % αποτελείται από σωματίδια > 0,50 mm, κοσκινίζεται σε 0,25 mm και τα δύο κλάσματα που προκύπτουν υποβάλλονται σε εξέταση.

2.1.3.3.5. Εκχύλιση και προετοιμασία του επιπλεύσματος: Μετά την ανάκτηση του ιζήματος με τη μέθοδο που περιγράφεται παραπάνω, στη διαχωριστική χοάνη θα πρέπει να μένουν δύο φάσεις: μια υγρή φάση, αποτελούμενη από τετραχλωροαιθυλένιο, και μια στερεή φάση, αποτελούμενη από το υλικό που επιπλέει. Αυτή η στερεή φάση είναι το επίπλευσμα και ανακτάται με την πλήρη έκχυση του τετραχλωροαιθυλένιο από τη χοάνη με το άνοιγμα της στρόφιγγας. Αφού αναστραφεί η διαχωριστική χοάνη, το επίπλευσμα μεταφέρεται σε ένα μεγάλο τρυβλίο Petri και αποξηραίνεται με αέρα σε συλλέκτη καπνών. Αν ποσοστό του επιπλεύσματος μεγαλύτερο από 5 % αποτελείται από σωματίδια > 0,50 mm, κοσκινίζεται σε 0,25 mm και τα δύο κλάσματα που προκύπτουν υποβάλλονται σε εξέταση.2.1.3.3.6. Προετοιμασία των πρώτων υλών: Παρασκευάζεται ποσότητα τουλάχιστον 5 g του αλεσμένου επιμέρους δείγματος. Αν ποσοστό της πρώτης ύλης μεγαλύτερο από 5 % αποτελείται από σωματίδια > 0,50 mm, κοσκινίζεται σε 0,25 mm και τα δύο κλάσματα που προκύπτουν υποβάλλονται σε εξέταση.

## 2.1.3.4. Παρασκευή δειγμάτων που αποτελούνται από λίπη ή έλαια

Το ακόλουθο πρωτόκολλο εφαρμόζεται για την παρασκευή δειγμάτων που αποτελούνται από λίπη ή έλαια:

- αν το λίπος είναι στερεό, θερμαίνεται σε φούρνο έως ότου υγροποιηθεί,
- με τη χρήση πιπέτας, μεταφέρονται 40 ml λίπους ή ελαίου από τον πυθμένα του δείγματος σε σωλήνα φυγοκέντρησης,
- πραγματοποιείται φυγοκέντρηση επί 10 λεπτά σε 4 000 r.p.m.,
- αν το λίπος είναι στερεό μετά τη φυγοκέντρηση, θερμαίνεται σε φούρνο έως ότου υγροποιηθεί,
- επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση επί 5 λεπτά σε 4 000 r.p.m.,

- με τη χρήση μικρού κουταλιού ή σπάτουλας, το ήμισυ των προσμειξεων που έχουν αποχυθεί μεταφέρεται σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου προς εξέταση· ως μονιμοποιητικό μέσο συνιστάται η γλυκερόλη,
- οι υπόλοιπες προσμειξεις χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του ιζήματος, με τον τρόπο που περιγράφεται στο σημείο 2.1.3.3.

#### 2.1.3.5. Χρήση αντιδραστηρίων χρώσης

Για να διευκολυνθεί η ορθή ταυτοποίηση των συστατικών ζωικής προέλευσης, ο χειριστής μπορεί να χρησιμοποιήσει αντιδραστήρια χρώσης κατά την παρασκευή του δείγματος σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές που έχουν εκδοθεί από το EURL-AP και έχουν αναρτηθεί στον δικτυακό του τόπο.

Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διάλυμα ερυθρού της αλιζαρίνης για τη χρώση του ιζήματος, εφαρμόζεται το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- το αποξηραμένο ίζημα μεταφέρεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και εκπλένεται δύο φορές με περίπου 5 ml αιθανόλης (κάθε φορά χρησιμοποιείται αναμεικτής vortex για 30 s· ο διαλύτης αφήνεται να κατακαθίσει για περίπου 1 min 30 s και αποχύνεται),
- το ίζημα υποβάλλεται σε λεύκανση με την προσθήκη τουλάχιστον 1 ml διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου. Η αντίδραση αφήνεται να εξελιχθεί για 10 min. Ο σωλήνας γεμίζει με νερό, το ίζημα αφήνεται να κατακαθίσει για 2-3 min, και το νερό μαζί με τα αιωρούμενα σωματίδια αποχύνονται με ήπιο τρόπο,
- το ίζημα εκπλένεται δύο ακόμα φορές με περίπου 10 ml νερού (χρησιμοποιείται αναμεικτής vortex για 30 s, αφήνεται να κατακαθίσει και το νερό αποχύνεται κάθε φορά),
- προστίθενται 2 έως 10 σταγόνες διαλύματος ερυθρού της αλιζαρίνης και το μείγμα αναμειγνύεται. Η αντίδραση αφήνεται να συντελεστεί για 30 s και το χρωματισμένο ίζημα εκπλένεται δύο φορές με περίπου 5 ml αιθανόλης και μετά εκπλένεται μία φορά με ακετόνη (κάθε φορά χρησιμοποιείται αναμεικτής vortex για 30 s· ο διαλύτης αφήνεται να κατακαθίσει για περίπου 1 min και αποχύνεται),
- το χρωματισμένο ίζημα αποξηραίνεται.

#### 2.1.4. Μικροσκοπική εξέταση

##### 2.1.4.1. Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου προετοιμάζονται από το ίζημα και, ανάλογα με την επιλογή του χειριστή, είτε από το επίπλευσμα είτε από την πρώτη ύλη. Σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί κοσκίνισμα κατά την προετοιμασία του δείγματος, προετοιμάζονται τα δύο κλάσματα που προκύπτουν (το λεπτόκοκκο και το χονδρόκοκκο). Τα προς δοκιμή τμήματα των κλασμάτων που απλώνονται στις αντικειμενοφόρες πλάκες είναι αντιπροσωπευτικά του συνολικού κλάσματος.

Προετοιμάζεται επαρκής αριθμός αντικειμενοφόρων πλακών ώστε να εξασφαλιστεί ότι μπορεί να εκτελεστεί πλήρες πρωτόκολλο εξέτασης, όπως προβλέπεται στο σημείο 2.1.4.2.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου μονιμοποιούνται με το κατάλληλο μονιμοποιητικό μέσο σύμφωνα με την τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (SOP) που έχει θεσπίσει το EURL-AP και δημοσιεύεται στον δικτυακό του τόπο. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύπτονται με καλυπτρίδες.

##### 2.1.4.2. Πρωτόκολλα παρατήρησης για την ανίχνευση ζωικών σωματιδίων σε σύνθετες ζωοτροφές και πρώτες ύλες ζωοτροφών

Οι προετοιμασμένες αντικειμενοφόρες πλάκες υποβάλλονται σε παρατήρηση σύμφωνα με τα πρωτόκολλα παρατήρησης που παρουσιάζονται στο διάγραμμα 1 για τις σύνθετες ζωοτροφές και τις πρώτες ύλες ζωοτροφών εκτός από τα καθαρά ιχθυάλευρα, ή στο διάγραμμα 2 για τα καθαρά ιχθυάλευρα.

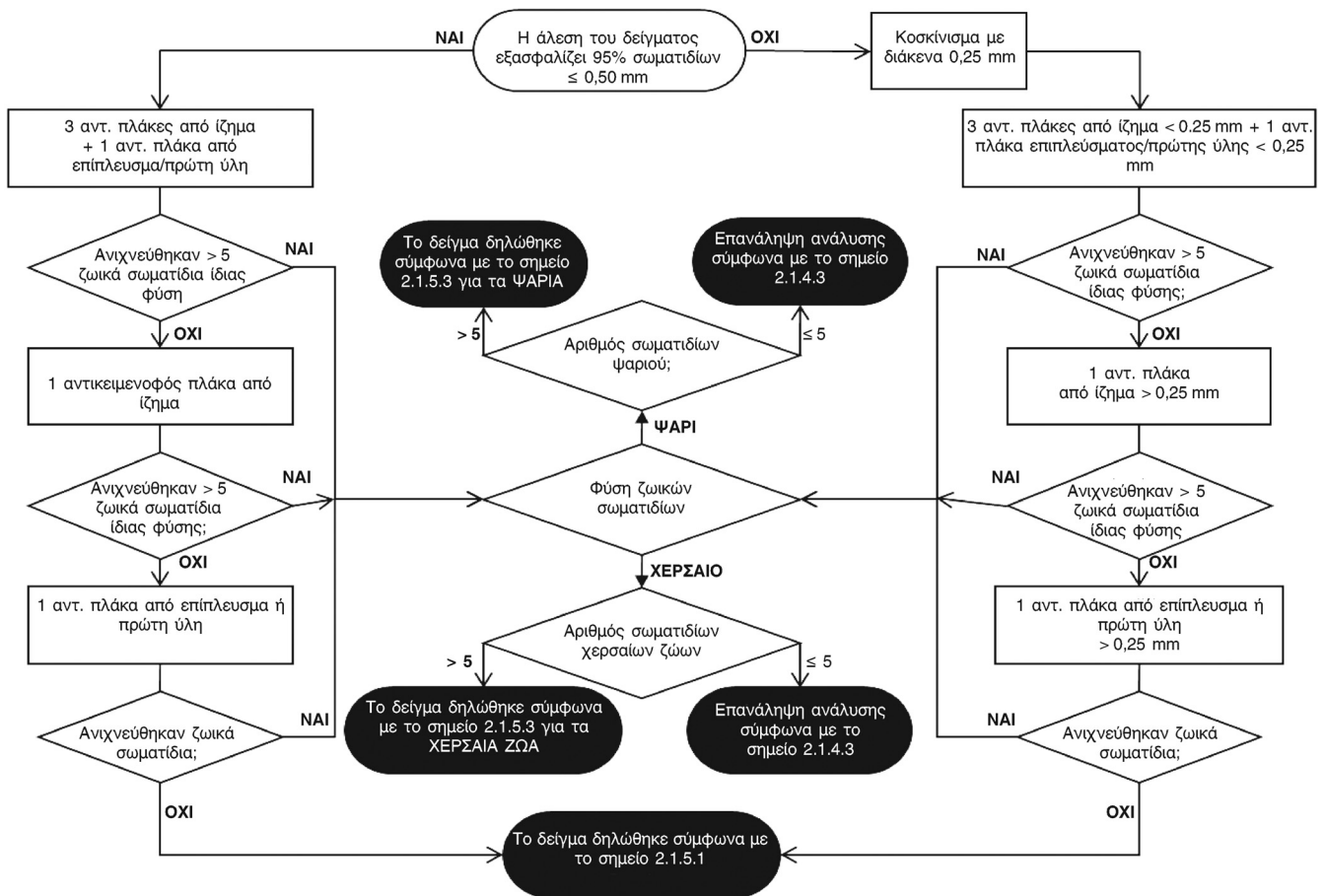
Οι παρατηρήσεις διενεργούνται με τη χρήση του απλού μικροσκοπίου στο ίζημα και, ανάλογα με την επιλογή του χειριστή, είτε στο επίπλευσμα είτε στην πρώτη ύλη. Το διόφθαλμο μικροσκόπιο μπορεί να χρησιμοποιείται επιπλέον του απλού μικροσκοπίου για τα χονδρόκοκκα κλάσματα. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα εξετάζεται πλήρως σε διάφορες μεγεθύνσεις.

Ο ελάχιστος αριθμός αντικειμενοφόρων πλακών που πρέπει να παρακολουθείται σε κάθε στάδιο του πρωτοκόλλου παρατήρησης πρέπει να τηρείται απολύτως, εκτός αν ολόκληρο το υλικό του κλάσματος δεν επιτρέπει την επίτευξη του καθορισμένου αριθμού αντικειμενοφόρων πλακών. Δεν υποβάλλονται σε παρατήρηση περισσότερες από 6 αντικειμενοφόρες πλάκες ανά προσδιορισμό.

Για να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση της φύσης και της προέλευσης των σωματιδίων, ο χειριστής μπορεί να χρησιμοποιήσει βοηθητικά εργαλεία, όπως συστήματα στήριξης αποφάσεων, συλλογές φωτογραφιών και δείγματα αναφοράς.

Διάγραμμα 1

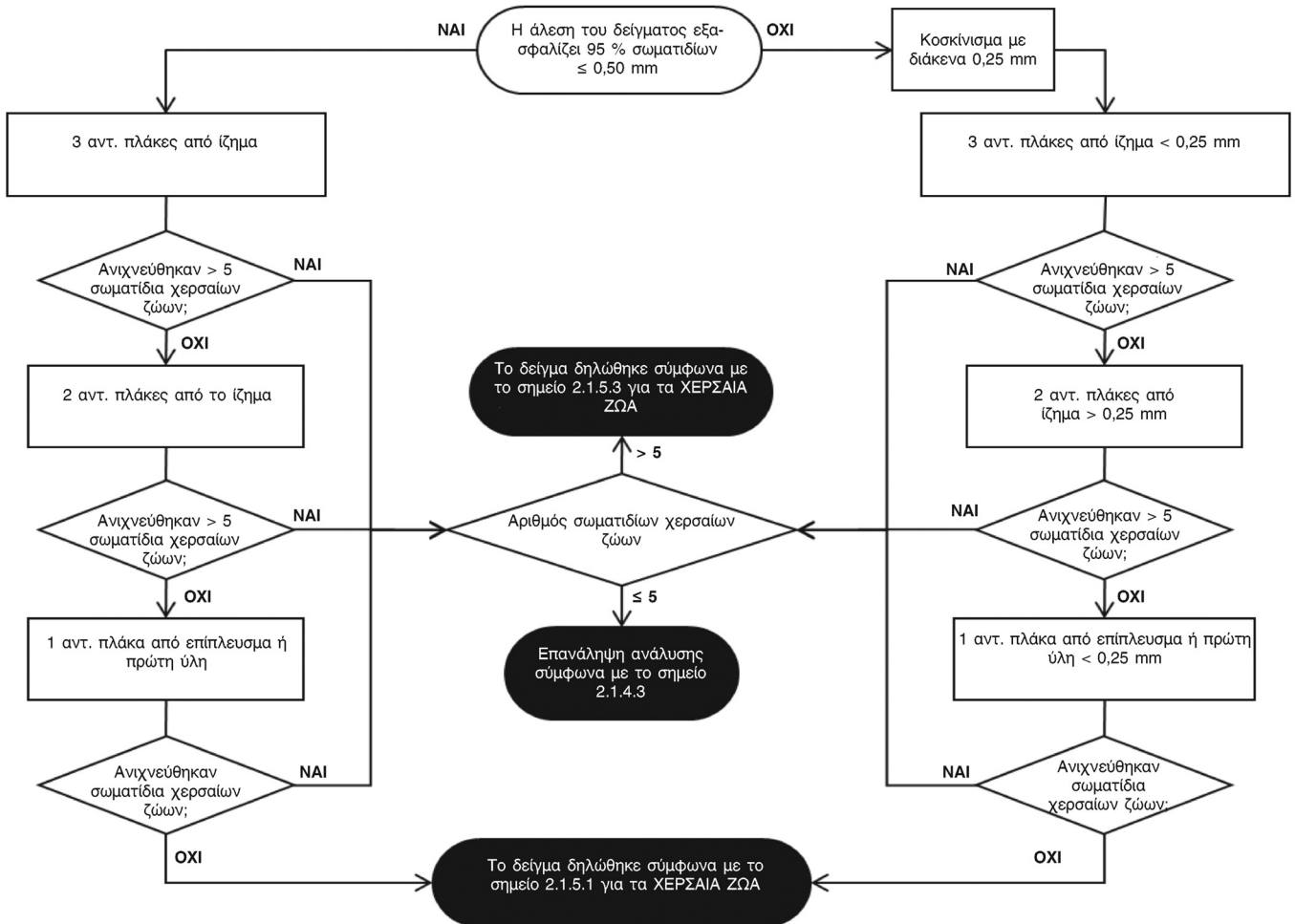
Πρωτόκολλο παρατήρησης για την ανίχνευση ζωικών σωματιδίων σε σύνθετες ζωοτροφές και πρώτες ύλες ζωοτροφών εκτός από ιχθυάλευρα





Διάγραμμα 2

## Πρωτόκολλο παρατήρησης για την ανίχνευση ζωικών σωματιδίων σε ιχθυάλευρα





#### 2.1.4.3. Αριθμός προσδιορισμών

Αν μετά τη διενέργεια ενός πρώτου προσδιορισμού σύμφωνα με το πρωτόκολλο παρατήρησης του διαγράμματος 1 ή του διαγράμματος 2, ανάλογα με την περίπτωση, δεν ανιχνευθούν ζωικά σωματίδια συγκεκριμένης φύσης (π.χ. χερσαίων ζώων ή ψαριών), δεν είναι αναγκαίος επιπλέον προσδιορισμός και το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.1.

Αν μετά τη διενέργεια ενός πρώτου προσδιορισμού σύμφωνα με το πρωτόκολλο παρατήρησης του διαγράμματος 1 ή του διαγράμματος 2, ανάλογα με την περίπτωση, ο συνολικός αριθμός των ανιχνευμένων ζωικών σωματιδίων συγκεκριμένης φύσης (π.χ. χερσαίων ζώων ή ψαριών) κυμαίνεται από 1 έως 5, διενεργείται δεύτερος προσδιορισμός από ένα νέο επιμέρους δείγμα 50 g. Αν μετά τον δεύτερο προσδιορισμό ο αριθμός των ανιχνευμένων ζωικών σωματιδίων της συγκεκριμένης φύσης κυμαίνεται από 0 έως 5, το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.2., διαφορετικά διενεργείται τρίτος προσδιορισμός από νέο επιμέρους δείγμα 50 g. Ωστόσο, αν μετά τον πρώτο και τον δεύτερο προσδιορισμό ο συνολικός αριθμός των σωματιδίων συγκεκριμένης φύσης που ανιχνεύθηκαν κατά τους δύο προσδιορισμούς είναι μεγαλύτερος από 15, δεν είναι αναγκαίος επιπλέον προσδιορισμός και το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται απευθείας με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.3. Αν μετά τον τρίτο προσδιορισμό ο συνολικός αριθμός των ζωικών σωματιδίων συγκεκριμένης φύσης που ανιχνεύθηκαν κατά τους τρεις προσδιορισμούς είναι μεγαλύτερος από 15, το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.3. Διαφορετικά, το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.2.

Αν μετά τη διενέργεια ενός πρώτου προσδιορισμού σύμφωνα με το πρωτόκολλο παρατήρησης του διαγράμματος 1 ή του διαγράμματος 2, ανάλογα με την περίπτωση, ανιχνευθούν περισσότερα από 5 ζωικά σωματίδια συγκεκριμένης φύσης (π.χ. χερσαίων ζώων ή ψαριών), το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.3.

#### 2.1.5. Έκφραση των αποτελεσμάτων

Κατά την καταγραφή των αποτελεσμάτων, το εργαστήριο επισημαίνει τον τύπο του υλικού επί του οποίου διενεργήθηκε η ανάλυση (ίζημα, επίπλευσμα ή πρώτη ύλη) και τον αριθμό των προσδιορισμών που διενεργήθηκαν.

Η έκθεση του εργαστηρίου πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον πληροφορίες σχετικά με την παρουσία συστατικών που προέρχονται από χερσαία ζώα και από ψάρια.

Οι διάφορες περιπτώσεις πρέπει να αναφέρονται με τους ακόλουθους τρόπους.

##### 2.1.5.1. Δεν ανιχνεύθηκαν ζωικά σωματίδια συγκεκριμένης φύσης:

- στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτοmikροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκε κανένα σωματίδιο που να προέρχεται από χερσαία ζώα,
- στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτοmikροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκε κανένα σωματίδιο που να προέρχεται από ψάρια.

##### 2.1.5.2. Ανιχνεύθηκαν, κατά μέσο όρο, από 1 έως 5 ζωικά σωματίδια συγκεκριμένης φύσης:

- στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτοmikροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκαν, κατά μέσο όρο και ανά προσδιορισμό, περισσότερα από 5 σωματίδια που προέρχονται από χερσαία ζώα. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [οστά, χόνδροι, μύες, τρίχες, κέρατα κ.λπ.]. Αυτή η παρουσία μικρών ποσοτήτων, αφού κυμαίνεται κάτω από το όριο ανίχνευσης της μικροσκοπικής μεθόδου, σημαίνει ότι ο κίνδυνος ψευδώς θετικού αποτελέσματος δεν μπορεί να αποκλειστεί:

ή, κατά περίπτωση,

- στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτοmikροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκαν, κατά μέσο όρο και ανά προσδιορισμό, περισσότερα από 5 σωματίδια που προέρχονται από ψάρια. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [ψαροκόκκαλα, λέπια, χόνδροι, μύες, ωτόλιθοι, βράγχια κ.λπ.]. Αυτή η παρουσία μικρών ποσοτήτων, αφού κυμαίνεται κάτω από το όριο ανίχνευσης της μικροσκοπικής μεθόδου, σημαίνει ότι ο κίνδυνος ψευδώς θετικού αποτελέσματος δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Σε περίπτωση προκοσκινίσματος του δείγματος, η έκθεση του εργαστηρίου επισημαίνει το κλάσμα (κοσκινισμένο κλάσμα, σύμπηκτο κλάσμα ή κόκκοι) στο οποίο ανιχνεύθηκαν ζωικά σωματίδια, στον βαθμό που η ανίχνευση ζωικών σωματιδίων μόνο στο κοσκινισμένο κλάσμα μπορεί να αποτελεί σημάδι μόλυνσης του περιβάλλοντος.

##### 2.1.5.3. Ανιχνεύθηκαν, κατά μέσο όρο, περισσότερα από 5 ζωικά σωματίδια συγκεκριμένης φύσης:

- στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτοmikροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε ανιχνεύθηκαν, κατά μέσο όρο και ανά προσδιορισμό, περισσότερα από 5 σωματίδια που προέρχονται από χερσαία ζώα. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [οστά, χόνδροι, μύες, τρίχες, κέρατα κ.λπ.].

ή, κατά περίπτωση,

— στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε ανιχνεύθηκαν, κατά μέσο όρο και ανά προσδιορισμό, περισσότερα από 5 σωματίδια που προέρχονται από ψάρια. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [ψαροκόκκαλα, λέπια, χόνδροι, μύες, ωτόλιθοι, βράγχια κ.λπ.].

Σε περίπτωση προκοσκινίσματος του δείγματος, η έκθεση του εργαστηρίου επισημαίνει το κλάσμα (κοσκινισμένο κλάσμα, σύμπηκτο κλάσμα ή κόκκοι) στο οποίο ανιχνεύθηκαν ζωικά σωματίδια, στον βαθμό που η ανίχνευση ζωικών σωματιδίων μόνο στο κοσκινισμένο κλάσμα μπορεί να αποτελεί σημάδι μόλυνσης του περιβάλλοντος.

## 2.2. PCR

### 2.2.1. Αρχή

Τα θραύσματα δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA) ζωικής προέλευσης που μπορεί να είναι παρόντα σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σύνθετες ζωοτροφές ανιχνεύονται με τεχνική γονιδιακής ενίσχυσης μέσω PCR, στοχοθετώντας αλληλουχίες DNA ειδικές για κάθε είδος ζώου.

Η μέθοδος PCR απαιτεί, κατά πρώτον, εκχύλιση DNA. Το στάδιο της ενίσχυσης εφαρμόζεται ακολούθως στο εκχύλισμα DNA που έχει αποκτηθεί μ' αυτόν τον τρόπο, προκειμένου να ανιχνευθεί το ζωικό είδος που στοχοθετείται από τη δοκιμή.

### 2.2.2. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός

#### 2.2.2.1. Αντιδραστήρια

##### 2.2.2.1.1. Αντιδραστήρια για το στάδιο της εκχύλισης DNA

Χρησιμοποιούνται μόνο αντιδραστήρια εγκεκριμένα από το EURL-AP και δημοσιευμένα στον δικτυακό του τόπο.

##### 2.2.2.1.2. Αντιδραστήρια για το στάδιο της γονιδιακής ενίσχυσης

###### 2.2.2.1.2.1. Εκκινητές και ανιχνευτές

Χρησιμοποιούνται μόνο εκκινητές και ανιχνευτές με αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που έχουν επικυρωθεί από το EURL-AP <sup>(1)</sup>.

###### 2.2.2.1.2.2. Master Mix

Χρησιμοποιούνται μόνο διαλύματα Master Mix που δεν περιέχουν αντιδραστήρια ικανά να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα λόγω της παρουσίας ζωικού DNA <sup>(2)</sup>.

###### 2.2.2.1.2.3. Αντιδραστήρια απομόλυνσης

###### 2.2.2.1.2.3.1. Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (0,1 N).

###### 2.2.2.1.2.3.2. Λευκαντικό (διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου σε 0,15 % ενεργού χλωρίου)

###### 2.2.2.1.2.3.3. Μη διαβρωτικά αντιδραστήρια για την απομόλυνση δαπανηρών συσκευών, όπως οι αναλυτικοί ζυγοί (π.χ. DNA Erase™ της MP Biomedicals)

### 2.2.2.2. Εξοπλισμός

#### 2.2.2.2.1. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 0,001 g

#### 2.2.2.2.2. Εξοπλισμός άλεσης

#### 2.2.2.2.3. Θερμικός κυκλοποιητής για την επίτευξη PCR πραγματικού χρόνου

#### 2.2.2.2.4. Μικροφυγοκεντρητής για σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης

#### 2.2.2.2.5. Σετ από μικροπιπέτες για τη μεταφορά ποσότητας από 1 μl έως 1 000 μl

#### 2.2.2.2.6. Τυποποιημένος πλαστικός εξοπλισμός μοριακής βιολογίας: σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης, πλαστικά ρύγχη με φίλτρο για μικροπιπέτες, δίσκοι κατάλληλοι για θερμικό κυκλοποιητή

#### 2.2.2.2.7. Καταψύκτες για την αποθήκευση δειγμάτων και αντιδραστηρίων

<sup>(1)</sup> Ο κατάλογος αυτών των εκκινητών και ανιχνευτών για κάθε ζωικό είδος που στοχοθετείται από τη δοκιμή διατίθεται στον δικτυακό τόπο του EURL-AP.

<sup>(2)</sup> Παραδείγματα διαλυμάτων Master Mix που είναι λειτουργικά διατίθενται στον δικτυακό τόπο του EURL-AP.

- 2.2.3. Δειγματοληψία και παρασκευή δείγματος
- 2.2.3.1. Δειγματοληψία
- Χρησιμοποιείται αντιπροσωπευτικό δείγμα, που λαμβάνεται σύμφωνα με τις διατάξεις που προβλέπονται στο παράρτημα I.
- 2.2.3.2. Προετοιμασία του δείγματος
- Η προετοιμασία εργαστηριακών δειγμάτων έως την εκχύλιση DNA πρέπει να πληρεί τις απαιτήσεις του παραρτήματος II. Για την ανάλυση και, στη συνέχεια, το άλεσμα πρέπει να συλλέγεται επιμέρους δείγμα τουλάχιστον 50 g του δείγματος.
- Η προετοιμασία του δείγματος πρέπει να διενεργείται σε χώρο διαφορετικό από εκείνους όπου πραγματοποιείται αποκλειστικά η εκχύλιση DNA και η γονιδιακή ενίσχυση, όπως περιγράφεται στο πρότυπο ISO 24276.
- Προετοιμάζονται δύο τμήματα προς δοκιμή τουλάχιστον 100 mg έκαστο.
- 2.2.4. Εκχύλιση DNA
- Η εκχύλιση DNA διενεργείται σε κάθε τμήμα προς δοκιμή που έχει προετοιμαστεί με τη χρήση της SOP που έχει θεσπίσει το EURL-AP και δημοσιεύεται στον δικτυακό του τόπο.
- Προετοιμάζονται δύο μάρτυρες εκχύλισης για κάθε σειρά εκχύλισης, όπως περιγράφεται στο πρότυπο ISO 24276:
- ένας αρνητικός μάρτυρας εκχύλισης,
  - ένας θετικός μάρτυρας εκχύλισης DNA.
- 2.2.5. Γονιδιακή ενίσχυση
- Η γονιδιακή ενίσχυση διενεργείται με τις επικυρωμένες μεθόδους για κάθε είδος που απαιτεί ταυτοποίηση. Αυτές οι μέθοδοι προβλέπονται στη SOP που έχει θεσπίσει το EURL-AP και δημοσιεύεται στον δικτυακό του τόπο. Κάθε εκχύλιμα DNA αναλύεται τουλάχιστον σε δύο διαφορετικά διαλύματα, ώστε να αξιολογηθεί η αναστολή.
- Προετοιμάζονται δύο μάρτυρες ενίσχυσης ανά στοχοθετημένο είδος, όπως περιγράφεται στο πρότυπο ISO 24276:
- χρησιμοποιείται θετικός μάρτυρας του DNA-στόχου για κάθε δίσκο ή σειρά δοκιμών PCR,
  - χρησιμοποιείται μάρτυρας του αντιδραστηρίου ενίσχυσης (γνωστός και ως δείγμα αναφοράς χωρίς DNA) για κάθε δίσκο ή σειρά δοκιμών PCR.
- 2.2.6. Ερμηνεία και έκφραση των αποτελεσμάτων
- Κατά την καταγραφή των αποτελεσμάτων, το εργαστήριο επισημαίνει τουλάχιστον το βάρος των τμημάτων δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν, τη μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόστηκε, τον αριθμό προσδιορισμών που διεξήχθησαν και το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.
- Τα αποτελέσματα δεν πρέπει να ερμηνεύονται και να καταγράφονται αν ο θετικός μάρτυρας εκχύλισης DNA και ο θετικός μάρτυρας του DNA-στόχου δεν παράγουν θετικά αποτελέσματα για τον υπό δοκιμή στόχο, ενώ ο μάρτυρας του αντιδραστηρίου ενίσχυσης είναι αρνητικός.
- Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα από τα δύο τμήματα δοκιμής δεν συμφωνούν μεταξύ τους, πρέπει να επαναλαμβάνεται τουλάχιστον η φάση της γονιδιακής ενίσχυσης. Αν το εργαστήριο υποπετεύεται ότι τα εκχυλίσματα DNA μπορεί να είναι η αιτία της ασυμφωνίας, διενεργούνται νέα εκχύλιση DNA και, στη συνέχεια, γονιδιακή ενίσχυση πριν από την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
- Η τελική έκφραση των αποτελεσμάτων βασίζεται στην ενσωμάτωση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δύο τμημάτων δοκιμής, σύμφωνα με τη SOP που έχει θεσπίσει το EURL-AP και δημοσιεύεται στον δικτυακό του τόπο.
- 2.2.6.1. Αρνητικό αποτέλεσμα
- Το αρνητικό αποτέλεσμα καταγράφεται ως εξής:
- Στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκε DNA από X (όπου X είναι το ζωικό είδος ή η ομάδα ζωικών ειδών που στοχοθετείται από τη δοκιμή).
- 2.2.6.2. Θετικό αποτέλεσμα
- Το θετικό αποτέλεσμα καταγράφεται ως εξής:
- Στο δείγμα που εξετάστηκε ανιχνεύθηκε DNA από X (όπου X είναι το ζωικό είδος ή η ομάδα ζωικών ειδών που στοχοθετείται από τη δοκιμή).»