KOMISSION TÄYTÄNTÖÖNPANOASETUS (EU) 2022/893,

annettu 7 päivänä kesäkuuta 2022,

asetuksen (EY) N:o 152/2009 liitteen VI muuttamisesta siltä osin kuin on kyse rehujen sisältämien maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien määritysmenetelmistä rehujen virallista valvontaa varten

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon virallisesta valvonnasta ja muista virallisista toimista, jotka suoritetaan elintarvike- ja rehulainsäädännön ja eläinten terveyttä ja hyvinvointia, kasvien terveyttä ja kasvinsuojeluaineita koskevien sääntöjen soveltamisen varmistamiseksi, sekä Euroopan parlamentin ja neuvoston asetusten (EY) N:o 999/2001, (EY) N:o 396/2005, (EY) N:o 1069/2009, (EY) N:o 1107/2009, (EU) N:o 1151/2012, (EU) N:o 652/2014, (EU) 2016/429 ja (EU) 2016/2031, neuvoston asetusten (EY) N:o 1/2005 ja (EY) N:o 1099/2009 ja neuvoston direktiivien 98/58/EY, 1999/74/EY, 2007/43/EY, 2008/119/EY ja 2008/120/EY muuttamisesta ja Euroopan parlamentin ja neuvoston asetusten (EY) N:o 854/2004 ja (EY) N:o 882/2004, neuvoston direktiivien 89/608/ETY, 89/662/ETY, 90/425/ETY, 91/496/ETY, 96/23/EY, 96/93/EY ja 97/78/EY ja neuvoston päätöksen 92/438/ETY kumoamisesta 15 päivänä maaliskuuta 2017 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EU) 2017/625 ([1]) (virallista valvontaa koskeva asetus) ja erityisesti sen 34 artiklan 6 kohdan ensimmäisen alakohdan a alakohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Komission asetuksessa (EY) N:o 152/2009 ([2]) vahvistetaan testimenetelmät, joilla tuetaan käsitellyn eläinproteiinin käyttöä elintarviketuotantoeläinten rehussa koskevan kiellon noudattamiseen liittyvää virallista valvontaa. Niihin sisältyvät kyseisen asetuksen liitteessä VI esitetyt valomikroskopiaan tai polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvat menetelmät eläinperäisten ainesosien määrittämiseksi rehujen virallista valvontaa varten.

(2) Kasvatetuista hyönteisistä saadun käsitellyn eläinvalkuaisen käyttö vesiviljelyeläinten rehussa on hyväksytty komission asetuksella (EU) 2017/893 ([3]) sekä sikaeläinten ja siipikarjan rehussa komission asetuksella (EU) 2021/1372 ([4]), mutta se on edelleen kielletty Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 999/2001 ([5]) nojalla tietyissä rehuissa, erityisesti märehtijöiden rehussa.

(3) Rehuissa esiintyvää eläinproteiinia käsittelevä Euroopan unionin vertailulaboratorio on kehittänyt ja validoinut erityisen menettelyn, johon sisältyy kaksinkertainen sedimentaatiovaihe, jolla varmistetaan maalla elävistä selkärangattomista, mukaan lukien hyönteisistä, peräisin olevien hiukkasten havaitseminen laboratoriokokeisiin toimitetuista rehuaineista, rehuseoksista ja esiseoksista. Tätä lisävaiheen sisältävää menettelyä olisi käytettävä virallisen valvonnan yhteydessä sen todentamiseksi, että kieltoa käyttää hyönteisistä peräisin olevaa käsiteltyä eläinvalkuaista tietyissä elintarviketuotantoeläinten rehuissa valvotaan asianmukaisesti.

([1]) EUVL L 95, 7.4.2017, s. 1.

([2]) Komission asetus (EY) N:o 152/2009, annettu 27 päivänä tammikuuta 2009, näytteenotto- ja määritysmenetelmistä rehujen virallista valvontaa varten (EUVL L 54, 26.2.2009, s. 1).

([3]) Komission asetus (EU) 2017/893, annettu 24 päivänä toukokuuta 2017, Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 999/2001 liitteiden I ja IV ja komission asetuksen (EU) N:o 142/2011 liitteiden X, XIV ja XV muuttamisesta käsiteltyä eläinvalkuaista koskevien säännösten osalta (EUVL L 138, 25.5.2017, s. 92).

([4]) Komission asetus (EU) 2021/1372, annettu 17 päivänä elokuuta 2021, Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 999/2001 liitteen IV muuttamisesta siltä osin kuin on kyse kiellosta ruokkia muita tuotantoeläimiä kuin märehtijöitä, turkiseläimiä lukuun ottamatta, eläinvalkuaisella (EUVL L 295, 18.8.2021, s. 1).

([5]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 999/2001, annettu 22 päivänä toukokuuta 2001, tiettyjen tarttuvien spongiformisten enkefalopatioiden ehkäisyä, valvontaa ja hävittämistä koskevista säännöistä (EYVL L 147, 31.5.2001, s. 1).

(4) Asetuksen (EY) N:o 152/2009 liitteessä VI esitettyä valomikroskopiamenetelmän kuvausta tulisi näin ollen muuttaa, jotta näytteiden valmistelun menettelyyn voidaan sisällyttää kaksinkertainen sedimentaatiovaihe sellaisille näytteille, joita testataan maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi.

(5) Sen vuoksi asetuksen (EY) N:o 152/2009 liitettä VI olisi muutettava.

(6) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän kasvi-, eläin-, elintarvike- ja rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 152/2009 liite VI tämän asetuksen liitteen mukaisesti.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 7 päivänä kesäkuuta 2022.

Komission puolesta
Puheenjohtaja
Ursula VON DER LEYEN

LIITE

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 152/2009 liite VI seuraavasti:

1) Korvataan 1 kohta seuraavasti:

”1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Rehujen eläinperäiset ainesosat olisi määritettävä valomikroskopialla tai polymeraasiketjureaktiolla (PCR) tässä liitteessä vahvistettujen säännösten mukaisesti.

Näillä kahdella menetelmällä on mahdollista havaita eläinperäisten ainesosien esiintyminen esiseoksissa, rehuaineissa ja rehuseoksissa. Niillä ei kuitenkaan ole mahdollista laskea kyseisten ainesosien määrää esiseoksissa, rehuaineissa ja rehuseoksissa. Kummankin menetelmän toteamisraja on alle 0,1 % (w/w).

PCR-menetelmän ansiosta esiseoksissa, rehuaineissa ja rehuseoksissa esiintyvien eläinperäisten ainesosien taksonominen ryhmä on mahdollista tunnistaa.

Näitä menetelmiä on käytettävä valvottaessa Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 999/2001 (*) 7 artiklan 1 kohdassa ja liitteessä IV sekä asetuksen (EY) N:o 1069/2009 (**) 11 artiklan 1 kohdassa säädettyjen kieltojen täytäntöönpanoa.

Näitä menetelmiä voidaan käyttää joko yksin tai yhdessä testattavasta rehutyypistä riippuen yhden operatiivisen protokollan puitteissa rehuissa esiintyvää eläinproteiinia käsittelevän EU:n vertailulaboratorion (EURL-AP) laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden (***) (Standard Operating Procedures, SOP) mukaisesti.

(*) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 999/2001, annettu 22 päivänä toukokuuta 2001, tiettyjen tarttuvien spongiformisten enkefalopatioiden ehkäisyä, valvontaa ja hävittämistä koskevista säännöistä (EYVL L 147, 31.5.2001, s. 1).

(**) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1069/2009, annettu 21 päivänä lokakuuta 2009, muiden kuin ihmisravinnoksi tarkoitettujen eläimistä saatavien sivutuotteiden ja niistä johdettujen tuotteiden terveyssäännöistä sekä asetuksen (EY) N:o 1774/2002 kumoamisesta (sivutuoteasetus) (EUVL L 300, 14.11.2009, s. 1).

(***) https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/.”;

2) Korvataan 2.1 kohta seuraavasti:

”2.1 **Valomikroskopia**

2.1.1 *Periaate*

Määritettäväksi lähetetyissä esiseoksissa, rehuaineissa ja rehuseoksissa mahdollisesti esiintyvät eläinperäiset ainesosat tunnistetaan tyypillisten mikroskooppisesti tunnistettavissa olevien ominaisuuksien, kuten lihassäikeiden ja muiden lihan palojen, ruston, luiden, sarvien, karvojen, harjasten, selkärangattomien kutikulan osasten, hyönteisten ilmaputkiston, verituotteiden, maidon rasvapallosten, laktoosikiteiden, höyhenten, munankuorten, kalanluiden ja suomujen, perusteella.

Mikroskooppitutkimus suoritetaan sen jälkeen, kun näytteet on esikäsitelty sedimentaatiolla.

Näytteiden sedimentaatiovaihe toteutetaan seuraavasti:

a) muiden eläinperäisten ainesosien kuin maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi yksittäinen sedimentaatiovaihe tetrakloorietyleenillä (TCE) kohdassa 2.1.3.4.3 kuvatulla tavalla;

b) maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi kaksinkertainen sedimentaatiovaihe petrolieetterillä / tetrakloorietyleenillä (PE/TCE) kohdassa 2.1.3.4.4 kuvatulla tavalla.

2.1.2 *Reagenssit ja laitteet*

2.1.2.1 Reagenssit

2.1.2.1.1 Konsentrointireagenssi

— Tetrakloorietyleeni (suhteellinen tiheys 1,62).

— Petrolieetteri (PE), kiehumispiste 40–60 °C (suhteellinen tiheys 0,65).

2.1.2.1.2 Värjäysreagenssi

— Alitsariinipunaliuos (laimennetaan 2,5 ml:aa 1 M:n kloorivetyhappoa 100 ml:aan vettä ja lisätään liuokseen 200 mg alitsariinipunaista).

2.1.2.1.3 Kiinnitysreagenssit

— Lipeä (NaOH 2,5 % w/v tai KOH 2,5 % w/v).

— Glyseroli (laimentamaton, viskositeetti: 1 490 cP) tai kiinnitysreagenssi, jolla on muun kuin kestopreparaatin valmisteluun soveltuvat ominaisuudet.

— Norland ® Optical Adhesive 65 (viskositeetti: 1 200 cP) tai hartsi, jolla on kestopreparaatin valmistukseen soveltuvat ominaisuudet.

2.1.2.1.4 Kiinnitysreagenssit, joilla on värjäysominaisuuksia

— Lugolin liuos (2 g kaliumjodidia liuotetaan 100 ml:aan vettä ja lisätään 1 g jodia ja sekoitetaan useita kertoja).

— Kystiinireagenssi (2 g lyijyasetaattia, 10 g NaOH/100 ml vettä).

— Fehlingin liuos (valmistetaan ennen käyttöä kahdesta samansuuruisesta osasta (1/1) varastoliuosta A ja B. Liuos A: liuotetaan 6,9 g:aa kupari(II)sulfaattipentahydraattia 100 ml:aan vettä. Liuos B: liuotetaan 34,6 g:aa kaliumnatriumtartraattitetrahydraattia ja 12 g:aa NaOH:ta 100 ml:aan vettä).

— Tetrametyylibentsidiini/vetyperoksidi (liuotetaan 1 g 3,3',5,5'-tetrametyylibentsidiiniä (TMB) 100 ml:aan jääetikkaa ja 150 ml:aan vettä. Ennen käyttöä 4 osaa TMB-liuosta sekoitetaan yhteen osaan 3-prosenttista vetyperoksidia.

2.1.2.1.5 Pesureagenssit

— Etanoli ≥ 96 % (tekninen laatu).

— Asetoni (tekninen laatu).

2.1.2.1.6 Värinpoistoreagenssi

— Kaupallinen natriumhypokloriittiliuos (9–14 % aktiivista klooria).

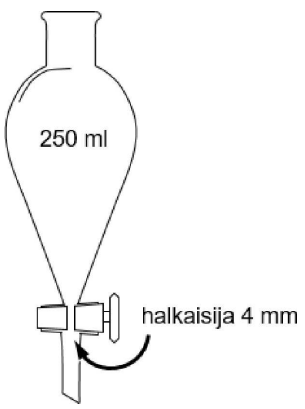
2.1.2.2. Laitteet

— Analyysivaaka, tarkkuus 0,001 g.

— Jauhamisvälineet: veitsimylly tai roottorimylly. Jos käytetään roottorimyllyä, kielletään seulat, jotka ovat ≤ 0,5 mm.

— Seulat, joissa on neliönmuotoiset reiät, silmäkoko 0,25 mm ja 1 mm. Näytteen esiseulontaa lukuun ottamatta seulojen halkaisija ei saa olla suurempi kuin 10 cm, jotta aineksia ei katoa. Seuloja ei tarvitse kalibroida.

— Kartiomainen erotussuppilo, lasia, 250 ml, jonka pohjalla on teflon- tai lasihioshana sulkutulppana. Sulkutulpan halkaisijan on oltava avattuna ≥ 4 mm. Vaihtoehtoisesti, ainoastaan yksittäistä sedimentaatiovaihetta tetrakloorietyleenillä varten, voidaan käyttää kartiopohjaista selkeytysastiaa, jos laboratorio on osoittanut, että toteamisrajat ovat vastaavia kuin lasista kartionmuotoista erotussuppiloa käytettäessä.



Erotussuppilo

— Stereomikroskooppi, jonka suurennusväli on ainakin 6,5×–40×.

— Läpivalaisumikroskooppi, jonka suurennusväli on vähintään 100×–400×. Lisäksi voidaan käyttää polarisoitua valomikroskopiaa ja differentiaali-interferenssikontrastimikroskopiaa.

— Tavanomaiset laboratorion lasiastiat.

— Objektilasien valmisteluvälineet: tavalliset objektilasit, objektilasit, joissa on syvennys, peitelasit (20 × 20 mm), pinsetit, ohut spaatteli.

— Laboratoriouuni

— Sentrifugi.

— Suodatinpaperi: Kvalitatiivinen selluloosasuodatin (huokoskoko 4–11 µm)

2.1.3 *Näytteenotto ja näytteiden valmistus*

2.1.3.1 Näytteenotto

Käytetään liitteen I mukaisesti otettua edustavaa näytettä.

2.1.3.1.1 Näytteen kuivaus:

Näytteet, joiden kosteuspitoisuus on > 14 %, on kuivattava ennen liitteen III mukaista käsittelyä.

2.1.3.1.2 Näytteen esiseulonta:

Jotta rehussa olevista mahdollisista ympäristön epäpuhtauksista saadaan tietoa, suositetaan, että pelletoitu rehu ja jyvät esiseulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 1 mm, ja saadut kaksi fraktiota, joita on pidettävä erillisinä näytteinä, valmistetaan ja määritetään erikseen ja niistä raportoidaan erikseen.

2.1.3.2 Varotoimenpiteet

Ristikontaminaation välttämiseksi laboratoriossa kaikki uudelleenkäytettävät välineet on puhdistettava huolellisesti ennen käyttöä. Erotussuppilon osat on irrotettava ennen puhdistusta. Erotussuppilon osat ja lasiastiat on esipestävä käsin ja sen jälkeen pestävä astianpesukoneessa. Seulat on puhdistettava jäykkäharjaksisella synteettisellä harjalla. Rasvaisten ainesten, kuten kalajauhon, seulonnan jälkeen suositetaan, että seulat puhdistetaan asetonilla ja paineilmalla.

2.1.3.3 Rasvasta tai öljystä koostuvien näytteiden esikäsittely

Rasvasta koostuvien näytteiden esikäsittelyssä on noudatettava seuraavaa menettelyä:

— Jos rasva on kiinteää, sitä lämmitetään uunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.

— 40 ml rasvaa pipetoidaan näytteen pohjasta sentrifugiputkeen.

— Näytettä sentrifugoidaan 10 minuuttia nopeudella 4 000 kierrosta minuutissa (rpm).

— Jos rasva on jähmettynyt sentrifugoinnin aikana, sitä lämmitetään uunissa, kunnes se muuttuu nestemäiseksi.

— Sentrifugoidaan uudestaan 5 minuuttia nopeudella 4 000 kierrosta minuutissa (rpm).

— Puolet dekantoiduista epäpuhtauksista siirretään pienellä lusikalla tai spaattelilla objektilasille mikroskooppista tutkimusta varten. Kiinnitysreagenssiksi suositetaan glyserolia.

— Loput epäpuhtauksista käytetään sedimentin valmisteluun 2.1.3.4.3 kohdan ensimmäisessä luetelmakohdassa kuvatulla tavalla.

Samaa menettelyä käytetään öljystä koostuvien näytteiden esikäsittelyyn lukuun ottamatta ensimmäistä ja neljättä luetelmakohtaa.

2.1.3.4 Muiden kuin rasva- tai öljynäytteiden esikäsittely

2.1.3.4.1 Osanäytteen otto ja jauhaminen: Osanäytteeksi otetaan vähintään 50 g näytteestä ja jauhetaan.

2.1.3.4.2 Raaka-aineen esikäsittely: Valmistetaan vähintään 5 g:n annos jauhettua osanäytettä. Se seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm:n, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.

2.1.3.4.3 Yksittäinen sedimentaatio tetrakloorietyleenillä muiden eläinperäisten ainesosien kuin maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi.

— Sedimentin uutto ja valmistus:

10 g:n annos (0,01 g:n tarkkuudella) jauhettua osanäytettä siirretään erotussuppiloon tai kartiopohjaiseen selkeytysastiaan, minkä jälkeen siihen lisätään 50 ml tetrakloorietyleeniä. Erotussuppiloon siirrettävä annos saa olla enintään 3 g, jos kyseessä on kalajauho tai muu puhtaasti eläintuote, kivennäisainesosa tai esiseos, joka tuottaa yli 10 prosenttia sedimenttiä. Seosta ravistetaan voimakkaasti ainakin 30 sekuntia, minkä jälkeen siihen lisätään varovasti 50 ml tetrakloorietyleeniä samalla kun suppilon sisäpinta pestään siihen mahdollisten tarttuneiden partikkelien poistamiseksi. Saadun seoksen annetaan laskeutua astian pohjalle vähintään viisi minuuttia, minkä jälkeen sedimentti erotetaan avaamalla sulkutulppa.

Jos käytetään kartiopohjasta selkeytysastiaa, seosta sekoitetaan voimakkaasti vähintään 15 sekunnin ajan ja mahdolliset astian seinämien sisäpintaan tarttuneet partikkelit pestään huolellisesti pois vähintään 10 ml:lla puhdasta tetrakloorietyleeniä. Seoksen annetaan laskeutua kolmen minuutin ajan, minkä jälkeen sitä sekoitetaan taas 15 sekunnin ajan ja mahdolliset astian seinämien sisäpintaan tarttuneet partikkelit pestään huolellisesti pois vähintään 10 ml:lla puhdasta tetrakloorietyleeniä. Saadun seoksen annetaan laskeutua vähintään 5 minuutin ajan, minkä jälkeen nestemäinen fraktio poistetaan ja poistetaan huolellisesti dekantoimalla samalla kun huolehditaan siitä, ettei sedimenttiä menetetä.

Sedimentti kerätään suppiloon asetettuun suodatinpaperiin, jotta jäljelle jäävä tetrakloorietyleeni voidaan erottaa ja samalla välttää rasvan laskeutuminen sedimenttiin. Sedimentti kuivataan. Sedimentaatiovaiheen tarkastamiseksi on sen jälkeen suositeltavaa punnita sedimentti (0,001 gramman tarkkuudella). Lopuksi sedimentti seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan, paitsi jos seulontaa ei pidetä tarpeellisena.

— Näytteen kelluvan osan, flotaatin, erottaminen ja esikäsittely:

Edellä kuvatulla menetelmällä tehdyn sedimentin talteenoton jälkeen erotussuppiloon pitäisi jäädä kaksi osaa: tetrakloorietyleenistä koostuva nestemäinen osa ja kelluvasta aineksesta muodostuva kiinteä osa. Tätä kiinteää osaa kutsutaan flotaatiksi, ja se otetaan talteen avaamalla suppilon tulppa ja kaatamalla tetrakloorietyleeni pois. Erotussuppilo käännetään ylösalaisin ja flotaatti siirretään suureen petrimaljaan ja kuivataan ilmassa vetokaapissa. Se seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm:n, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan.

— Värjäysreagenssien käyttö:

Eläinperäisten ainesosien oikean tunnistamisen helpottamiseksi laboratorio voi käyttää näytteen valmistelussa värjäysreagensseja EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien ohjeiden mukaisesti.

Jos sedimentin värjäämiseen käytetään alitsariinipunaliuosta, noudatetaan seuraavaa menettelyä:

— Kuivattu sedimentti siirretään lasiseen koeputkeen ja pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan ja annetaan liuottimen selkeytyä noin yhden minuutin ja 30 sekunnin ajan ennen sen dekantointia).

— Sedimentti käsitellään värinpoistoreagenssilla lisäämällä sedimenttiin vähintään 1 ml natriumhypokloriittiliuosta. Reaktion annetaan jatkua 10 minuutin ajan. Putki täytetään vedellä, sedimentin annetaan laskeutua 2–3 minuutin ajan, ja sen jälkeen vesi ja suspendoituneet partikkelit dekantoidaan kevyesti.

— Sedimentti pestään vielä kahdesti noin 10 ml:lla vettä (kummallakin kerralla käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan, sedimentin annetaan laskeutua putken pohjaan ja vesi dekantoidaan).

— Lisätään alitsariinipunaliuosta 2–10 tippaa ja sekoitetaan seosta koeputkisekoittimella. Sedimentin annetaan reagoida liuoksen kanssa 30 sekunnin ajan, ja värjäytynyt sedimentti pestään kahdesti noin 5 ml:lla etanolia ja sen jälkeen kerran asetonilla (joka kerta käytetään koeputkisekoitinta 30 sekunnin ajan ja annetaan liuottimen selkeytyä noin minuutin ajan, minkä jälkeen liuos dekantoidaan).

— Värjäytynyt sedimentti kuivataan.

2.1.3.4.4 Kaksinkertainen sedimentaatio petrolieetterillä / tetrakloorietyleenillä maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi.

Kaikissa vaiheissa on käytettävä 2.1.2.2 kohdan neljännessä luetelmakohdassa kuvattua lasista kartionmuotoista 250 ml:n erotussuppiloa.

— 10 g:n annos (0,01 g:n tarkkuudella) jauhettua osanäytettä siirretään erotussuppiloon ja sille tehdään yksittäinen sedimentaatio tetrakloorietyleenillä 2.1.3.4.3 kohdassa kuvatulla tavalla mukaan lukien sedimentin kerääminen suppiloon asetettuun suodatinpaperiin. Tätä sedimenttiä voidaan käyttää samoin kuin kohdan 2.1.3.4.3 mukaisesti kerättyä sedimenttiä.

— Sedimentin kanssa valutettu tetrakloorietyleeni siirretään asteikolliseen mittalasiin. Avataan erotussuppilon sulkutulppa ja täytetään mittalasia, kunnes saadaan 30 ml tetrakloorietyleeniä. Kun määrä on saavutettu, sulkutulppa suljetaan.

— Kerätty tetrakloorietyleenin määrä korvataan lisäämällä erotussuppiloon 30 ml petrolieetteriä, jonka kiehumispiste on 40–60 °C. Erotussuppilon sisältö sekoitetaan huolellisesti, jotta saadaan seos, jossa on 30 prosenttia petrolieetteriä ja 70 prosenttia tetrakloorietyleeniä (tiheys noin 1,26 $g.cm^{-3}$). Annetaan aineen laskeutua 10 minuuttia. Kaksi uutta fraktiota erottuu: toinen sedimentti ja lopullinen flotaatti (< 1,26 $g.cm^{-3}$). Toinen sedimentti kerätään petrimaljaan (tai suppiloon asetettuun suodatinpaperiin) avaamalla sulkutulppa kunnes vain vähän liuosseosta ja lopullinen flotaatti jäävät erotussuppiloon. Jäljelle jäänyt neste ja lopullinen flotaatti on kerättävä erikseen suppiloon asetettuun suodatinpaperiin. Erotussuppilon seinämät on huuhdeltava petrolieetterillä, jotta saadaan kerättyä kaikki lopullisen flotaatin materiaali. Lopullisen flotaatin annetaan kuivua. Lopullinen flotaatti seulotaan seulalla, jonka silmäkoko on 0,25 mm, ja saadut kaksi fraktiota tutkitaan maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi, paitsi jos seulontaa ei pidetä tarpeellisena.

2.1.4 *Mikroskooppinen tutkimus*

2.1.4.1 Objektilasin valmistelu

Objektilasit valmistellaan sedimentistä ja laboratorion valinnan mukaan joko flotaatista tai raaka-aineesta. Silloin kuin se on aiheellista maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi, objektilaseja on valmistettava myös lopullisesta flotaatista, joka on kerätty 2.1.3.4.4 kohdassa kuvatulla tavalla. Tuloksena saadut kaksi fraktiota (hieno ja karkea) valmistellaan. Objektilasille levitettävien fraktion testinäytteiden on oltava koko fraktiota edustavia.

Objektilaseja on valmisteltava riittävä määrä sen varmistamiseksi, että 2.1.4.2 kohdassa säädettyä tutkimusprotokollaa voidaan noudattaa kokonaisuudessaan.

Objektilaseilla on käytettävä riittävästi kiinnitysreagenssia EURL-AP:n laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien toimintaohjeiden mukaisesti. Objektilaseilla käytetään peitinlaseja.

2.1.4.2 Vuokaaviot rehuseosten, rehuaineiden ja esiseosten sisältämien eläimestä peräisin olevien partikkelien havaitsemiseksi.

Valmisteltuja objektilaseja on tutkittava mikroskoopilla noudattaen kaavioissa 1 ja 2 esitettyjä vuokaavioita.

Mikroskooppitutkimus suoritetaan läpivalaisumikroskoopilla tutkimalla sedimenttiä ja laboratorion valinnan mukaan flotaattia tai raaka-ainetta. Lisäksi maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi tutkimuksia on suoritettava myös lopullisesta flotaatista, joka on kerätty 2.1.3.4.4 kohdassa kuvatulla tavalla ja noudattaen kaaviota 3. Karkeita fraktioita voidaan läpivalaisumikroskoopin lisäksi tutkia stereomikroskoopilla. Jokainen objektilasi tutkitaan läpikotaisin eri suurennuksilla. Tarkat selitykset vuokaavioiden käytöstä annetaan EURL-AP:n laatimissa ja verkkosivuillaan julkaisemissa SOP-toimintaohjeissa (Standard Operating Procedures).

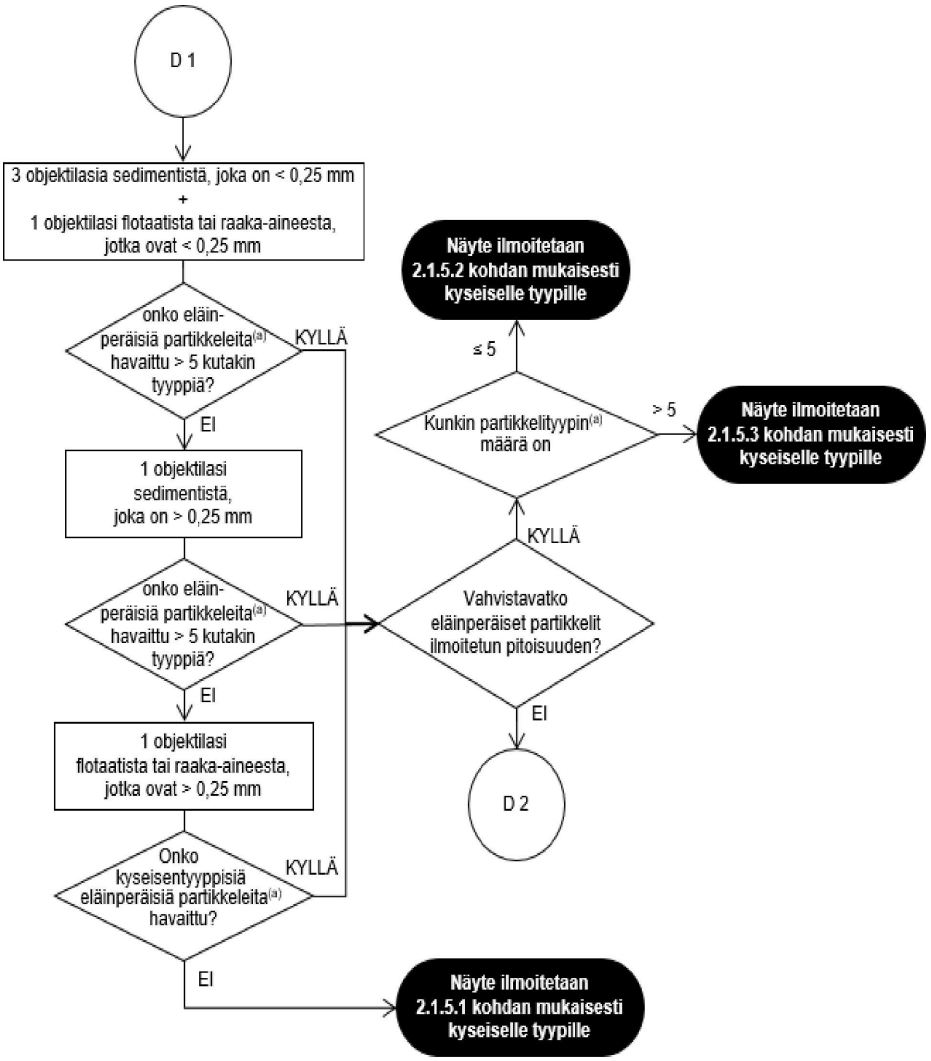
Vuokaavion kussakin vaiheessa havainnoitavien objektilasien vähimmäismäärää on noudatettava tarkasti, paitsi jos määrättyä objektilasimäärää ei ole mahdollista saavuttaa fraktioaineksen koon vuoksi, esimerkiksi jos sedimenttiä ei saada. Partikkelien määrän kirjaamiseen saa käyttää enintään kuusi objektilasia määritystä kohti.

Valmisteltaessa lisäobjektilaseja joko flotaatista tai raaka-aineesta käyttäen 2.1.2.1.4 kohdassa tarkoitettuja erityisiä kiinnitysreagensseja, joilla on värjäysominaisuuksia, kun pyritään saamaan lisää tietoa sellaisista rakenteista (kuten sulat, karva, lihas tai veripartikkelit), jotka on havaittu 2.1.2.1.3 kohdassa tarkoitetuilla muilla kiinnitysreagensseilla valmistelluilla objektilaseilla, partikkelien määrä lasketaan määritystä kohti käytettävien objektilasien määrän perusteella, joka voi olla enintään kuusi, mukaan lukien lisäobjektilasit, joissa käytetään erityistä kiinnitysreagenssia. Lisäobjektilaseja, jotka on valmistettu 2.1.3.4.4 kohdassa kuvatulla tavalla kerätystä lopullisesta flotaatista ja tarkoitettu maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi, ei tule käyttää muuntyyppisten (maalla elävät selkärankaiset ja kalat) ainesosien tunnistamiseen.

Jotta partikkelien tyyppi ja alkuperä olisi helpompi tunnistaa, laboratorio voi käyttää apuvälineitä, esimerkiksi päätöksentekoa tukevia järjestelmiä, kuvakirjastoja ja vertailunäytteitä.

Kaavio 1

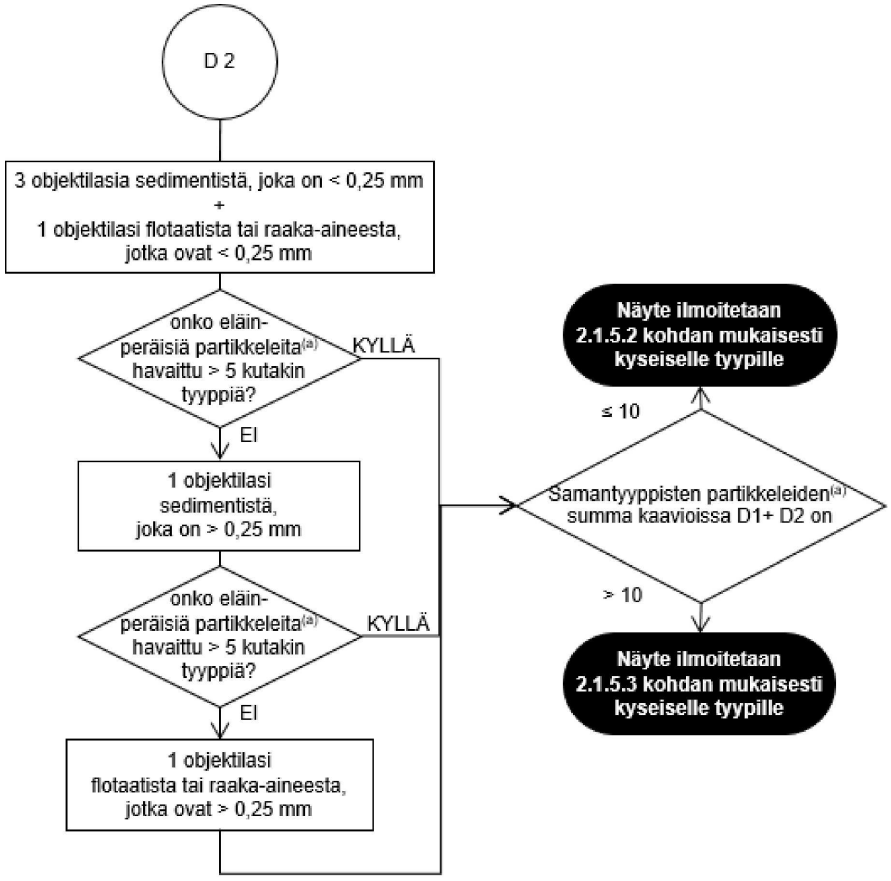
Vuokaavio tetrakloorietyleenillä toteutetun yksittäisen sedimentaation jälkeen rehuseosten, rehuaineiden ja esiseoksien sisältämien muista kuin maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien partikkelien havaitsemiseksi ensimmäisessä määrityksessä



("D1" ja "D2" viittaavat ensimmäiseen ja toiseen määritykseen; (a): maalla elävät selkärankaiset, kalat)

Kaavio 2

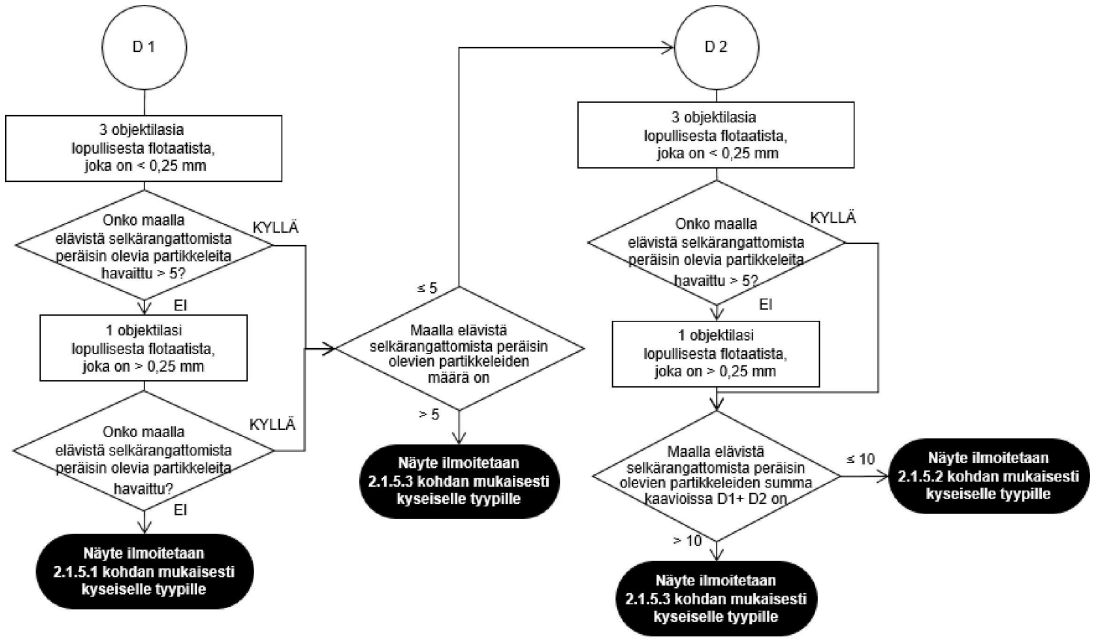
Vuokaavio tetrakloorietyleenillä toteutetun yksittäisen sedimentaation jälkeen rehuseosten, rehuaineiden ja esiseoksien sisältämien muista kuin maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien partikkelien havaitsemiseksi toisessa määrityksessä



("D1" ja "D2" viittaavat ensimmäiseen ja toiseen määritykseen; (a): maalla elävät selkärankaiset, kalat)

Kaavio 3

Vuokaavio petroolieetterillä / tetrakloorietyleenillä toteutetun kaksinkertaisen sedimentaation jälkeen rehuseosten, rehuaineiden ja esiseoksien sisältämien maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevien ainesosien havaitsemiseksi



("D1" ja "D2" viittaavat ensimmäiseen ja toiseen määritykseen)

2.1.4.3 Määritysten lukumäärä

Määritykset on tehtävä erilaisista 50 gramman osanäytteistä.

Jos kaaviossa 1 tai tarvittaessa kaaviossa 3 vahvistetun vuokaavion mukaisesti suoritetun ensimmäisen määrityksen jälkeen ei havaita eläinperäisiä partikkeleita, lisämääritys ei ole tarpeen, ja määrityksen tulos raportoidaan 2.1.5.1 kohdassa vahvistettua vakiomuotoilua käyttäen.

Jos kaaviossa 1 vahvistetun vuokaavion mukaisesti suoritetun ensimmäisen määrityksen jälkeen kyseisentyyppisiä eläinperäisiä partikkeleita (esim. maalla eläviä selkärankaisia tai kaloja) havaitaan yksi tai useampi ja havaitut partikkelit vahvistavat näytteen ilmoitetun pitoisuuden, toista määritystä ei tarvita. Jos tämän ensimmäisen määrityksen aikana havaittujen kyseisentyyppisten eläinperäisten partikkelien määrä on suurempi kuin viisi, määrityksen tulos ilmoitetaan eläintyypeittäin 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua vakiomuotoilua käyttäen. Muussa tapauksessa määrityksen tulos ilmoitetaan eläintyypeittäin 2.1.5.2 kohdassa vahvistettua vakiomuotoilua käyttäen.

Jos kaaviossa 3 vahvistetun vuokaavion mukaisesti suoritetun ensimmäisen määrityksen jälkeen havaitaan enemmän kuin viisi maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevaa eläinperäistä partikkelia, toinen määritys ei ole tarpeen, ja määrityksen tulos raportoidaan 2.1.5.3 kohdassa tätä tarkoitusta varten vahvistettua vakiomuotoilua käyttäen.

Kaikissa muissa tapauksissa, mukaan lukien tilanteet, joissa laboratoriolle ei ole toimitettu pitoisuutta koskevaa ilmoitusta, tehdään toinen määritys uudesta osanäytteestä. Jos kaaviossa 2 tai tarvittaessa kaaviossa 3 vahvistetun vuokaavion mukaisesti tehdyn toisen määrityksen jälkeen näissä kahdessa määrityksessä havaittujen kyseisentyyppisten eläinperäisten partikkelien summa on yhteensä suurempi kuin kymmenen, määrityksen tulos ilmoitetaan eläintyypeittäin 2.1.5.3 kohdassa vahvistettua vakiomuotoilua käyttäen. Muussa tapauksessa määrityksen tulos ilmoitetaan eläintyypeittäin 2.1.5.2 kohdassa vahvistettua vakiomuotoilua käyttäen.

2.1.5 *Tulosten ilmoittaminen*

Laboratorion on tuloksista raportoidessaan ilmoitettava mistä aineksesta määritys on tehty (sedimentti, flotaatti, lopullinen flotaatti tai raaka-aine). Raportoinnista on käytävä selvästi ilmi, kuinka monta määritystä on tehty ja onko fraktioita seulottu edellä olevan 2.1.3.4.3 kohdan ensimmäisen alakohdan kolmannen kappaleen mukaisesti tai 2.1.3.4.4 kolmannen alakohdan mukaisesti ennen objektilasin valmistusta.

Laboratorion raportin on sisällettävä ainakin tieto maalla elävistä selkärankaisista ja kalasta peräisin olevien ainesosien esiintymisestä.

Eri tuloksista raportoidaan seuraavasti:

2.1.5.1 Kyseisentyyppistä eläinperäistä partikkelia ei havaittu:

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä ei valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella todettu maalla elävistä selkärankaisista peräisin olevia partikkeleita.”

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä ei valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella todettu kalasta peräisin olevia partikkeleita.”

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä ei valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella todettu maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevia partikkeleita.”

2.1.5.2 Kyseisentyyppisiä eläinperäisiä partikkeleita havaittu 1–5, kun vain yksi määritys on tehty, tai 1–10, kun kaksi määritystä on tehty (havaittujen partikkelien määrä on pienempi kuin rehuissa esiintyvää eläinproteiinia käsittelevän EU:n vertailulaboratorion (EURL-AP) laatimien ja verkkosivuillaan julkaisemien SOP-toimintaohjeiden mukainen päätösraja):

Kun vain yksi määritys on tehty:

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enintään viisi maalla elävistä selkärankaisista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi … [luut, rustot, lihas, karva, sarvi, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enintään viisi kalasta peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”

Kun on tehty kaksi määritystä:

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrityksen yhteydessä enintään kymmenen maalla elävistä selkärankaisista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi … [luut, rustot, lihas, karva, sarvi, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrityksen yhteydessä enintään kymmenen kalasta peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrityksen yhteydessä enintään kymmenen maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi … [kutikulan osaset, suuosat, lihas, ilmaputkisto, muu (yksilöidään tarvittaessa)]. Tämä vähäinen määrä on tälle mikroskooppiselle menetelmälle vahvistetun päätösrajan alapuolella.”

Lisäksi:

— Jos näyte esiseulotaan, laboratorion on mainittava raportissaan fraktio (seulottu fraktio, pelletoitu fraktio tai jyvät), josta eläinperäiset partikkelit on havaittu, sillä jos eläinperäisiä partikkeleita havaitaan ainoastaan seulotusta fraktiosta, kyse saattaa olla ympäristön epäpuhtauksista.

— Jos havaitaan ainoastaan sellaisia eläinperäisiä partikkeleita, joita ei voida luokitella maalla eläviksi selkärankaisiksi eikä kaloiksi (esim. lihassäikeet), raportissa on mainittava, että ainoastaan tällaisia eläinperäisiä partikkeleita havaittiin ja ettei voida sulkea pois sitä, että ne ovat mahdollisesti peräisin maalla elävistä selkärankaisista.

2.1.5.3 Kyseisentyyppisiä eläinperäisiä partikkeleita havaittu enemmän kuin viisi, kun vain yksi määritys on tehty, tai enemmän kuin kymmenen, kun kaksi määritystä on tehty:

Kun vain yksi määritys on tehty:

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enemmän kuin viisi maalla elävistä selkärankaisista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi … [luut, rustot, lihas, karva, sarvi, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enemmän kuin viisi kalasta peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella enemmän kuin viisi maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi … [kutikulan osaset, suuosat, lihas, ilmaputkisto, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”

Kun on tehty kaksi määritystä:

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrityksen yhteydessä enemmän kuin kymmenen maalla elävistä selkärankaisista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi … [luut, rustot, lihas, karva, sarvi, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrityksen yhteydessä enemmän kuin kymmenen kalasta peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi ... [kalanruoto, kalan suomu, rusto, lihas, otoliitti, kidus, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”

— ”Laboratorioon toimitetussa näytteessä todettiin valomikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella kahden määrityksen yhteydessä enemmän kuin kymmenen maalla elävistä selkärangattomista peräisin olevaa partikkelia. Partikkelit tunnistettiin seuraaviksi … [kutikulan osaset, suuosat, lihas, ilmaputkisto, muu (yksilöidään tarvittaessa)].”

Lisäksi:

— Jos näyte esiseulotaan, laboratorion on mainittava raportissaan fraktio (seulottu fraktio, pelletoitu fraktio tai jyvät), josta eläinperäiset partikkelit on havaittu, sillä jos eläinperäisiä partikkeleita havaitaan ainoastaan seulotusta fraktiosta, kyse saattaa olla ympäristön epäpuhtauksista.

— Jos havaitaan ainoastaan sellaisia eläinperäisiä partikkeleita, joita ei voida luokitella maalla eläviksi selkärankaisiksi eikä kaloiksi (esim. lihassäikeet), raportissa on mainittava, että ainoastaan tällaisia eläinperäisiä partikkeleita havaittiin ja ettei voida sulkea pois sitä, että ne ovat mahdollisesti peräisin maalla elävistä selkärankaisista.”