PROVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2022/893

od 7. lipnja 2022.

o izmjeni Priloga VI. Uredbi (EZ) br. 152/2009 u pogledu metoda za određivanje sastojaka životinjskog podrijetla za službenu kontrolu hrane za životinje

(Tekst značajan za EGP)

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu (EU) 2017/625 Europskog parlamenta i Vijeća od 15. ožujka 2017. o službenim kontrolama i drugim službenim aktivnostima kojima se osigurava primjena propisa o hrani i hrani za životinje, pravila o zdravlju i dobrobiti životinja, zdravlju bilja i sredstvima za zaštitu bilja, o izmjeni uredaba (EZ) br. 999/2001, (EZ) br. 396/2005, (EZ) br. 1069/2009, (EZ) br. 1107/2009, (EU) br. 1151/2012, (EU) br. 652/2014, (EU) 2016/429 i (EU) 2016/2031 Europskog parlamenta i Vijeća, uredaba Vijeća (EZ) br. 1/2005 i (EZ) br. 1099/2009 i direktiva Vijeća 98/58/EZ, 1999/74/EZ, 2007/43/EZ, 2008/119/EZ i 2008/120/EZ te o stavljanju izvan snage uredaba (EZ) br. 854/2004 i (EZ) br. 882/2004 Europskog parlamenta i Vijeća, direktiva Vijeća 89/608/EEZ, 89/662/EEZ, 90/425/EEZ, 91/496/EEZ, 96/23/EZ, 96/93/EZ i 97/78/EZ te Odluke Vijeća 92/438/EEZ (Uredba o službenim kontrolama) ([1]), a posebno njezin članak 34. stavak 6. prvi podstavak točku (a),

budući da:

(1) Uredbom Komisije (EZ) br. 152/2009 ([2]) utvrđene su metode testiranja koje se primjenjuju kao potpora službenim kontrolama u cilju provedbe zabrane uporabe prerađenih životinjskih bjelančevina u hrani za životinje koje se koriste za proizvodnju hrane. To uključuje analitičke metode za određivanje sastojaka životinjskog podrijetla u okviru službene kontrole hrane za životinje, koje su opisane u Prilogu VI. toj uredbi i koje se provode svjetlosnom mikroskopijom ili lančanom reakcijom polimerazom (PCR).

(2) Upotreba prerađenih životinjskih bjelančevina dobivenih od kukaca iz uzgoja odobrena je u hrani za životinje akvakulture Uredbom Komisije (EU) 2017/893 ([3]), a u hrani za svinje i perad Uredbom Komisije (EU) 2021/1372 ([4]), ali je i dalje zabranjena na temelju Uredbe (EZ) br. 999/2001 Europskog parlamenta i Vijeća ([5]) u određenoj hrani za životinje, posebno u hrani za preživače.

(3) Referentni laboratorij Europske unije za životinjske bjelančevine u hrani za životinje razvio je i validirao poseban protokol, koji obuhvaća postupak dvostruke sedimentacije, kojim se osigurava detekcija čestica iz kopnenih beskralješnjaka, uključujući kukce, ako su prisutne u krmivima, krmnim smjesama i premiksima podvrgnutima laboratorijskom ispitivanju. Taj bi se protokol, s dodanim korakom, trebao upotrebljavati u okviru službenih kontrola radi provjere ispravne provedbe zabrane uporabe prerađenih životinjskih bjelančevina od kukaca u hrani za životinje koje se koriste za proizvodnju hrane.

([1]) SL L 95, 7.4.2017., str. 1.

([2]) Uredba Komisije (EZ) br. 152/2009 od 27. siječnja 2009. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu hrane za životinje (SL L 54, 26.2.2009., str. 1.).

([3]) Uredba Komisije (EU) 2017/893 od 24. svibnja 2017. o izmjeni priloga I. i IV. Uredbi (EZ) br. 999/2001 Europskog parlamenta i Vijeća te priloga X., XIV. i XV. Uredbi Komisije (EU) br. 142/2011 u pogledu odredaba o prerađenim životinjskim bjelančevinama (SL L 138, 25.5.2017., str. 92.).

([4]) Uredbe Komisije (EU) 2021/1372 od 17. kolovoza 2021. o izmjeni Priloga IV. Uredbi (EZ) br. 999/2001 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu zabrane hranidbe nepreživača iz uzgoja, osim krznaša, bjelančevinama dobivenima od životinja (SL L 295, 18.8.2021., str. 1.).

([5]) Uredba (EZ) br. 999/2001 Europskog parlamenta i Vijeća od 22. svibnja 2001. o utvrđivanju pravila za sprečavanje, kontrolu i iskorjenjivanje određenih transmisivnih spongiformnih encefalopatija (SL L 147, 31.5.2001., str. 1.).

(4) Opis metode svjetlosne mikroskopije iz Priloga VI. Uredbi (EZ) br. 152/2009 trebalo bi stoga prilagoditi kako bi se u protokol za pripremu uzoraka koje treba ispitati radi detekcije sastojaka kopnenih beskralješnjaka uključio postupak dvostruke sedimentacije.

(5) Prilog VI. Uredbi (EZ) br. 152/2009 trebalo bi stoga na odgovarajući način izmijeniti.

(6) Mjere predviđene u ovoj Uredbi u skladu su s mišljenjem Stalnog odbora za bilje, životinje, hranu i hranu za životinje,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Prilog VI. Uredbi (EZ) br. 152/2009 mijenja se u skladu s Prilogom ovoj Uredbi.

Članak 2.

Ova Uredba stupa na snagu dvadesetog dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 7. lipnja 2022.

Za Komisiju
Predsjednica
Ursula VON DER LEYEN

PRILOG

Prilog VI. Uredbi (EZ) br. 152/2009 mijenja se kako slijedi:

(1) točka 1. zamjenjuje se sljedećim:

„1. SVRHA I OPSEG

Određivanje sastojaka životinjskog podrijetla u hrani za životinje provodi se svjetlosnom mikroskopijom ili lančanom reakcijom polimerazom (PCR) u skladu s odredbama iz ovog Priloga.

Ove dvije metode omogućuju detekciju prisutnosti sastojaka životinjskog podrijetla u premiksima, krmivima i krmnim smjesama. Međutim, one ne omogućavaju izračun količine takvih sastojaka u premiksima, krmivima i krmnim smjesama. Obje metode imaju granicu detekcije ispod 0,1 % (m/m).

PCR metoda omogućuje određivanje taksonomske skupine sastojaka životinjskog podrijetla prisutnih u premiksima, krmivima i krmnim smjesama.

Te metode primjenjuju se pri kontroli provedbe zabrana iz članka 7. stavka 1. Uredbe (EZ) br. 999/2001 Europskog parlamenta i Vijeća (*), i Priloga IV. toj uredbi te iz članka 11. stavka 1. Uredbe (EZ) br. 1069/2009 Europskog parlamenta i Vijeća (**).

Ovisno o vrsti hrane za životinje koja se ispituje, te metode mogu se koristiti u okviru jednog jedinstvenog operativnog protokola bilo samostalno ili zajedno u skladu sa standardiziranim operativnim postupcima (SOP) koje je uspostavio referentni laboratorij EU-a za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP) i objavio na svojim internetskim stranicama (***).

_____

(*) Uredba (EZ) br. 999/2001 Europskog parlamenta i Vijeća od 22. svibnja 2001. o utvrđivanju pravila za sprečavanje, kontrolu i iskorjenjivanje određenih transmisivnih spongiformnih encefalopatija (SL L 147, 31.5.2001., str. 1.).

(**) Uredba (EZ) br. 1069/2009 Europskog parlamenta i Vijeća od 21. listopada 2009. o utvrđivanju zdravstvenih pravila za nusproizvode životinjskog podrijetla i od njih dobivene proizvode koji nisu namijenjeni prehrani ljudi te o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1774/2002 (Uredba o nusproizvodima životinjskog podrijetla) (SL L 300, 14.11.2009., str. 1.).

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

(2) točka 2.1. zamjenjuje se sljedećim:

„2.1. **Svjetlosna mikroskopija**

2.1.1. *Načelo*

Sastojci životinjskog podrijetla koji mogu biti prisutni u premiksima, krmivima i krmnim smjesama poslanima na analizu identificiraju se na temelju tipičnih i mikroskopski prepoznatljivih karakteristika kao što su mišićna vlakna i ostale čestice mesa, hrskavica, kosti, rogovi, dlaka, čekinje, kutikularni fragmenti beskralješnjaka, trahealne strukture kukaca, krv, kapljice mlijeka, kristali laktoze, perje, ljuske jaja, riblje kosti i krljušt.

Mikroskopska ispitivanja provode se nakon pripreme uzoraka sedimentacijom.

Uzorci se podvrgavaju postupku sedimentacije na sljedeći način:

(a) za detekciju sastojaka životinjskog podrijetla osim od kopnenih beskralješnjaka, postupak jednostruke sedimentacije tetrakloretilenom (TCE) kako je navedeno u točki 2.1.3.4.3.;

(b) za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka, postupak dvostruke sedimentacije petroleterom/tetrakloretilenom (PE/TCE), kako je opisano u točki 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Reagensi i oprema*

2.1.2.1. Reagensi

2.1.2.1.1. Sredstvo za koncentriranje

— Tetrakloretilen (specifična težina 1,62).

— Vrelište pertoletera (PE) 40–60 °C (specifična težina 0,65).

2.1.2.1.2. Reagens za bojenje

— Alizarin crvenilo (otopi se 2,5 ml 1M kloridne kiseline u 100 ml vode i toj se otopini doda 200 mg alizarin crvenila).

2.1.2.1.3. Sredstva za pripremu preparata

— Lužina (NaOH 2,5 % w/v ili KOH 2,5 % w/v)

— Glicerol (nerazrijeđen, viskoznost: 1 490 cP) ili sredstvo za pripremu preparata s ekvivalentnim svojstvima za pripremu privremenih preparata

— Norland ® Optical Adhesive 65 (viskoznost: 1 200 cP) ili smola s istovjetnim svojstvima za pripremu trajnih preparata.

2.1.2.1.4. Sredstva za pripremu preparata s osobinama bojenja

— Lugolova otopina (otopi se 2 g kalijevog jodida u 100 ml vode, zatim se uz često mućkanje doda 1 g joda)

— Cistinski reagens (2 g olovnog acetata, 10 g NaOH/100 ml vode)

— Fehlingov reagens (priprema se prije upotrebe od dijelova temeljnih otopina A i B u omjeru 1:1: otopina A (otopi se 6,9 g bakrova (II) sulfata pentahidrata u 100 ml vode): otopina B (otopi se 34,6 g kalijeva natrijeva tartarat tetrahidrata i 12 g NaOH u 100 ml vode).

— Tetrametilbenzidin/vodikov peroksid (otopi se 1 g 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) u 100 ml ledene octene kiseline i 150 ml vode. Prije uporabe pomiješa se otopina TMB-a s 3 %-tnim vodikovim peroksidom u omjeru 4:1.

2.1.2.1.5. Sredstva za ispiranje

— Etanol ≥ 96 % (tehnički čist).

— Aceton (tehnički čist).

2.1.2.1.6. Reagens za izbjeljivanje

— Komercijalna otopina natrijevog hipoklorita (9 – 14 % aktivnog klora).

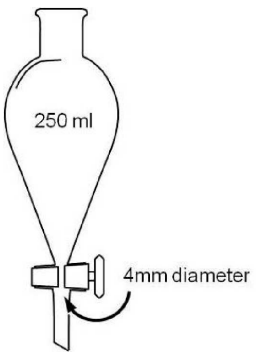
2.1.2.2. Oprema

— Analitička vaga s preciznošću od 0,001 g.

— Pribor za mljevenje: nož ili mlin s rotorom. Ako se koristi mlin s rotorom zabranjena je upotreba mlinskih sitâ ≤ 0,5 mm

— Sita s mrežicom kvadratnih očica širine 0,25 mm i 1 mm. Osim kod prethodnog prosijavanja uzorka, promjer sita ne smije biti veći od 10 cm kako bi se izbjegao gubitak materijala. Kalibracija sita nije potrebna.

— Konusni stakleni lijevak za odjeljivanje zapremine 250 ml s teflonskim čepom ili čepom od brušenog stakla na dnu konusa. Promjer otvora čepa mora biti ≥ 4 mm. Umjesto toga, samo za jednostruku sedimentaciju TCE-om, može se upotrijebiti čaša s konusnim dnom za sedimentaciju pod uvjetom da je laboratorij dokazao da su granice detekcije ekvivalentne onima koje se dobiju kada se koristi konusni stakleni lijevak za odjeljivanje.



Promjer 4 mm

— Stereomikroskop koji obuhvaća barem konačni opseg povećanja od 6,5× do 40×.

— Sastavljeni mikroskop koji obuhvaća barem konačni opseg povećanja od 100× do 400× s poljem za propušteno svjetlo. Mogu se dodatno koristiti polarizirano svjetlo, diferencijalni interferentni kontrast.

— Standardno laboratorijsko posuđe od stakla.

— Oprema za pripremu preparata: klasična mikroskopska stakalca, stakalca s udubinom, pokrovna stakalca (20×20 mm), pinceta, fina lopatica.

— Laboratorijska peć.

— Centrifuga.

— Filtar papir: kvalitativni celulozni filtar (veličine pora 4–11 μm).

2.1.3. *Uzorkovanje i priprema uzorka*

2.1.3.1. Uzorkovanje

Koristi se reprezentativan uzorak uzet u skladu Prilogom I.

2.1.3.1.1 Sušenje uzoraka

Uzorci sa sadržajem vlage > 14 % moraju se osušiti prije rukovanja u skladu s Prilogom III.

2.1.3.1.2 Prethodno prosijavanje uzorka:

Kako bi se prikupile informacije o mogućem okolišnom zagađenju hrane za životinje, preporučuje se da se hrana u peletima i zrnu prethodno prosije na 1 mm i da se dvije dobivene frakcije, koje se moraju smatrati različitim uzorcima, zatim odvojeno pripreme i analiziraju te da se o njima odvojeno izvijesti.

2.1.3.2. Mjere opreza

Kako bi se spriječila križna kontaminacija u laboratoriju, svu laboratorijsku opremu za višekratnu uporabu potrebno je pažljivo očistiti prije uporabe. Dijelove lijevka za odjeljivanje potrebno je prije čišćenja rastaviti. Dijelove lijevka za odjeljivanje i posuđe od stakla potrebno je prethodno oprati ručno, a zatim oprati u perilici posuđa. Sita se moraju očistiti četkom s tvrdim sintetičkim dlačicama. Preporuča se završno čišćenje sita acetonom i komprimiranim zrakom nakon prosijavanja masnog materijala, kao što je riblje brašno.

2.1.3.3. Priprema uzoraka koji se sastoje od masti ili ulja

Potrebno je slijediti sljedeći protokol za pripremu uzoraka koji se sastoje od masti:

— ako je mast u krutom stanju, zagrijava se u pećnici, dok ne postane tekuća.

— Koristeći pipetu prenese se 40 ml masti ili ulja s dna uzorka u epruvetu za centrifugiranje.

— Uzorak se centrifugira 10 minuta na 4 000 okr/min.

— Ako je mast nakon centrifugiranja u krutom stanju, zagrijava se u pećnici dok ne postane tekuća.

— Ponovo se centrifugira 5 minuta pri 4 000 okr/min.

— Žličicom ili spatulom prenese se polovica dekantirane nečistoće na mikroskopsko stakalce radi pregleda. Kao sredstvo za pripremu preparata preporuča se glicerol.

— Preostala nečistoća koristi se za pripremu taloga kako je opisano u točki 2.1.3.4.3., prvoj alineji.

Isti postupak, osim prve i četvrte alineje, primjenjuje se za pripremu uzoraka koji se sastoje od ulja.

2.1.3.4. Priprema uzoraka osim masti i ulja

2.1.3.4.1. Razdioba uzorka u poduzroke i mljevenje: barem 50 g uzorka razdijeli se na poduzorke za analizu koji se zatim melju.

2.1.3.4.2. Priprema sirovine: pripremi se dio od najmanje 5 g samljevenog poduzorka. Prosijava se na 0,25 mm te se dvije dobivene frakcije ispituju.

2.1.3.4.3. Jednostruka sedimentacija TCE-om za detekciju sastojaka životinjskog podrijetla osim kopnenih beskralješnjaka.

— Ekstrakcija i priprema taloga:

Prenese se dio od 10 g (s preciznošću od 0,01 g) samljevenog poduzorka u lijevak za odjeljivanje ili čašu s konusnim dnom za sedimentaciju i doda se 50 ml TCE-a. Dio koji je prenesen u lijevak mora se ograničiti na 3 g u slučaju ribljeg brašna ili drugih čistih proizvoda životinjskog podrijetla, mineralnih sastojaka ili premiksa koji proizvode više od 10 % taloga. Mješavinu je potrebno snažno protresti tijekom najmanje 30 s i mora se oprezno dodati još 50 ml TCE-a kako bi se isprale unutarnje stjenke lijevka i uklonile sve prijanjajuće čestice. Tako dobivena mješavina se ostavi stajati najmanje 5 minuta prije odvajanja taloga otvaranjem čepa.

Ako se koristi čaša s konusnim dnom za sedimentaciju, mješavinu je potrebno snažno miješati najmanje 15 s, a sve prianjajuće čestice uz stijenke čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutarnju površinu s najmanje 10 ml čistog TCE-a. Mješavina treba odstajati 3 minute i zatim ponovo promiješati 15 sekundi, a sve čestice koje prianjaju uz stijenke čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutarnju površinu s najmanje 10 ml čistog TCE-a. Tako dobivena mješavina treba odstajati najmanje 5 minuta, zatim se tekuća frakcija odstrani i ukloni pažljivim dekantiranjem, vodeći računa da se niti malo taloga ne izgubi.

Talog se prikuplja na filtar papiru koji se stavlja u lijevak kako bi se omogućilo odvajanje preostalog trikloretilena (TCE) i pritom izbjeglo nakupljanje masti u talogu. Talog se zatim suši. Preporučuje se da se talog zatim izvaže (s preciznošću od 0,001 g) u svrhu kontrole faze sedimentacija. Konačno, osim ako se prosijavanje smatra nepotrebnim, talog se prosijava na 0,25 mm te se dvije dobivene frakcije ispituju.

— Ekstrakcija i priprema flotata:

Nakon dobivanja taloga gore opisanom metodom, u lijevku za odjeljivanje moraju ostati dvije faze: tekuća koja se sastoji od TCE-a i kruta koja se sastoji od plivajućeg materijala. Ta kruta faza je flotat koji se izolira tako da se TCE u cijelosti odlije iz lijevka otvaranjem čepa. Okretanjem lijevka za odjeljivanje, flotat se prenese u veliku Petrijevu zdjelicu i posuši na zraku u digestoru. Prosijava se na 0,25 mm te se dvije dobivene frakcije ispituju.

— Uporaba reagensa za bojanje:

Kako bi se olakšala pravilna identifikacija sastojaka životinjskog podrijetla, subjekt može koristiti reagense za bojanje tijekom pripreme uzorka u skladu sa smjernicama koje je izdao EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici.

Ako se koristi otopina Alizarin crvenila za bojanje taloga primjenjuje se sljedeći protokol:

— Osušeni talog se prenese u staklenu epruvetu i dvaput ispere s približno 5 ml etanola (svaki se put koristi vrtložna miješalica tijekom 30 s, a otapalo se ostavi stajati približno 1 minutu i 30 s i zatim odlije),

— Talog se izbijeli dodavanjem najmanje 1 ml otopine natrijevog hipoklorita. Reakcija se razvija 10 minuta. Epruveta se napuni vodom, talog se ostavi stajati 2 - 3 minute, a voda i suspendirane čestice se pažljivo odliju,

— Talog se dvaput ispere s 10 ml vode (koristi se vrtložna miješalica 30 s, ostavi se istaložiti i svaki se put odlije voda),

— doda se 2 - 10 kapi otopine Alizarin crvenila i smjesa se promućka u vrtložnoj miješalici. Trajanje reakcije je 30 sekundi i obojeni talog se dvaput ispere s približno 5 ml etanola, zatim jedanput acetonom (svaki se put koristi vrtložna miješalica 30 s, a otapalo se ostavi stajati približno 1 minutu i zatim odlije),

— Obojeni talog se osuši.

2.1.3.4.4. Dvostruka sedimentacija PE/TCE za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka.

Svi se koraci moraju provesti u konusnom staklenom lijevku za odjeljivanje zapremnine 250 ml kako je opisano u točki 2.1.2.2., četvrtoj alineji.

— Dio od 10 g (s preciznošću od 0,01 g) samljevenog uzorka prenese se u lijevak za odjeljivanje i najprije se podvrgava jednostrukoj sedimentaciji TCE-om kako je opisano u točki 2.1.3.4.3., uključujući dobivanje taloga na filtar papiru postavljenom na lijevak. Taj se talog može upotrijebiti kao talog iz točke 2.1.3.4.3.

— Mali volumen TCE-a koji se iscijedi zajedno s talogom prenosi se u menzuru. Menzura se mora dodatno napuniti otvaranjem čepa lijevka za odjeljivanje dok se ne dobije 30 ml TCE-a. Kad se taj volumen dosegne, lijevak se začepi.

— Taj prikupljeni volumen TCE-a zamjenjuje se dodavanjem volumena od 30 ml petroletera točke vrelišta 40–60 °C u lijevak za odjeljivanje. Sadržaj lijevka za odjeljivanje mora se temeljito promiješati kako bi se dobila smjesa u omjeru 70 % TCE-a i 30 % PE-a (s gustoćom od približno 1,26 $g.cm^{-3}$). Materijal bi trebao odstajati 10 minuta. Odvojit će se dvije nove frakcije: drugi talog i konačni flotat (< 1,26 $g.cm^{-3}$). Drugi talog izolira se u Petrijevoj zdjelici (ili na filtar papiru postavljenom na lijevak) otvaranjem čepa dok u lijevku za odjeljivanje ne ostanu samo malo smjese otapala i konačni flotat. Preostala tekućina i konačni flotat prikupljaju se odvojeno na filtar papiru postavljenom na lijevak. Stjenka lijevka za odjeljivanje ispire se mlazom PE-a kako bi se sakupio sav materijal iz konačnog flotata. Konačni flotat se mora osušiti. Konačni flotat prosijava se na 0,25 mm, a dvije dobivene frakcije ispituju se radi detekcije sastojaka kopnenih beskralješnjaka, osim ako se prosijavanje smatra nepotrebnim.

2.1.4. *Mikroskopiranje*

2.1.4.1. Priprema preparata

Mikroskopski preparat priprema se od taloga i, po izboru laboranta, od flotata ili sirovine. Prema potrebi, samo za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka, priprema se i preparat od konačnog flotata dobivenog kako je opisano u točki 2.1.3.4.4. Pripremaju se dvije dobivene frakcije (sitna i gruba). Pokusni dijelovi frakcija naneseni na stakalca reprezentativni su za čitavu frakciju.

Potrebno je pripremiti dovoljan broj preparata kako bi se osigurala provedba čitavog ispitnog protokola koji je određen u točki 2.1.4.2.

Mikroskopski preparati se pripremaju s odgovarajućim sredstvom za pripremu preparata u skladu sa SOP-om koji je odredio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici. Preparate je potrebno pokriti pokrovnim stakalcima.

2.1.4.2. Dijagram toka pregleda za detekciju životinjskih čestica u krmnim smjesama, krmivima i premiksima.

Pripremljeni mikroskopski preparati promatraju se u skladu s dijagramima toka pregleda propisanima u dijagramima 1. i 2.

Mikroskopski pregledi provode se koristeći sastavljeni mikroskop na talogu i, po izboru laboranta, na flotatu ili na sirovini. Uz sastavljeni mikroskop može se koristiti i stereomikroskop za grube frakcije. Osim toga, za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka opažanja se provode i na konačnom flotatu dobivenom kako je opisano u točki 2.1.3.4.4. u skladu s dijagramom 3. Uz sastavljeni mikroskop može se koristiti i stereomikroskop za grube frakcije. Svaki preparat pregledava se u cijelosti i pod različitim povećanjima. Precizna objašnjenja o korištenju dijagrama toka pregleda detaljno su navedena u standardiziranim operativnim postupcima (SOP) koje je utvrdio referentni laboratorij EU-a za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP) i objavio na svojim internetskim stranicama.

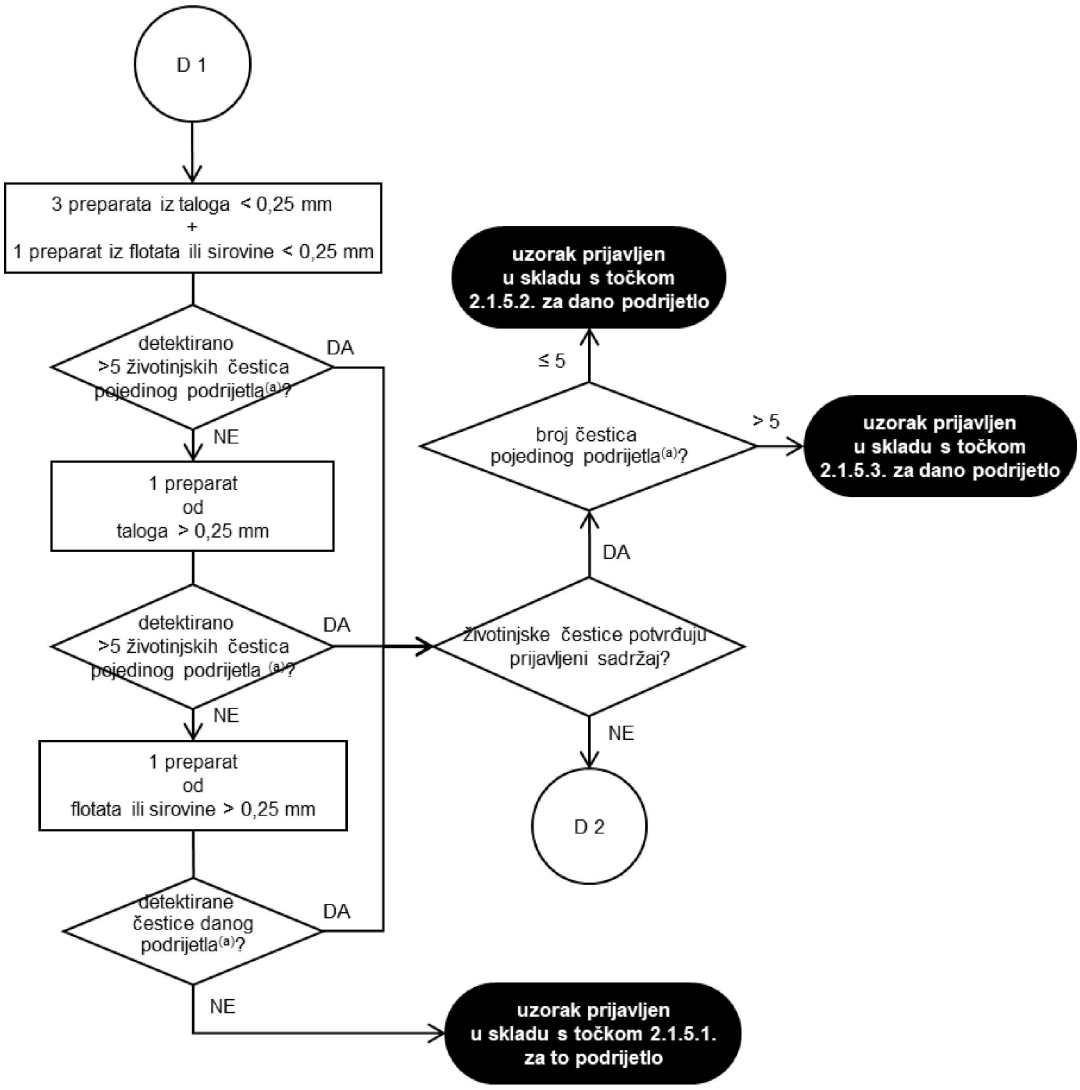
Najmanji broj preparata koji se mora promotriti u svakoj fazi dijagramâ toka pregleda mora se strogo poštovati, osim u slučajevima kada cijeli materijal frakcije ne omogućuje postizanje utvrđenog broja preparata, primjerice u slučaju nedobivanja taloga. Pri svakom određivanju upotrebljava se najviše 6 preparata za bilježenje broja čestica.

Ako se pripremaju dodatni preparati uporabom specifičnijeg sredstva za pripremu preparata s osobinama bojenja, kako je opisano u točki 2.1.2.1.4., na flotatu ili sirovini za daljnju karakterizaciju struktura (npr. perje, kosa, mišićne čestice ili čestice krvi), koje su detektirane na preparatima dobivenima uporabom drugih sredstava za pripremu preparata, kako je opisano u točki 2.1.2.1.3., broj čestica računa se na temelju najviše 6 preparata po određivanju, uključujući dodatne preparate sa specifičnijim sredstvom za pripremu preparata. Dodatni preparati pripremljeni od konačnog flotata dobivenog kako je opisano u točki 2.1.3.4.4. za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka ne uzimaju se u obzir za identifikaciju drugih podrijetla (kopneni kralješnjaci i ribe).

Za lakšu identifikaciju vrste i podrijetla čestica laborant može koristiti pomoćne alate kao što su sustavi za potporu pri odlučivanju, zbirke slika i referentni uzorci.

Dijagram 1.

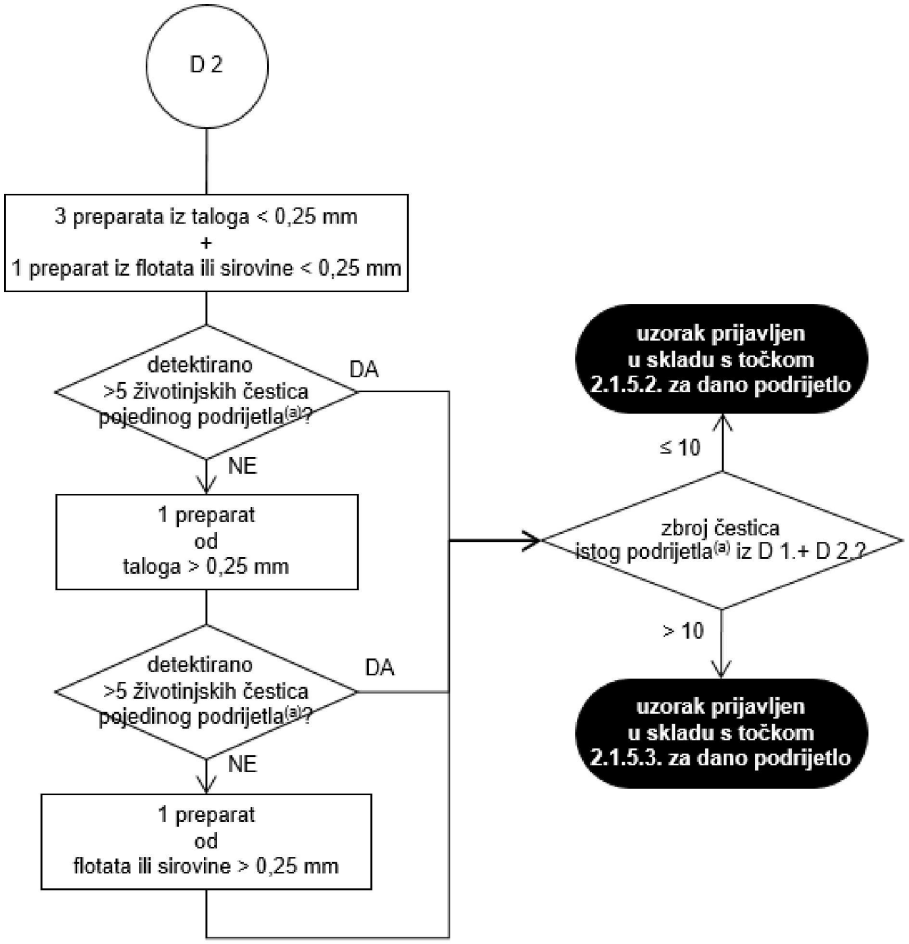
Dijagram toka pregleda nakon jednostruke sedimentacije TCE-om za detekciju životinjskih čestica osim čestica kopnenih beskralješnjaka u krmnim smjesama, krmivima i premiksima za prvo određivanje



(D1 i D2 odnose se na prvo i drugo određivanje; (a): kopneni kralježnjaci, ribe)

Dijagram 2.

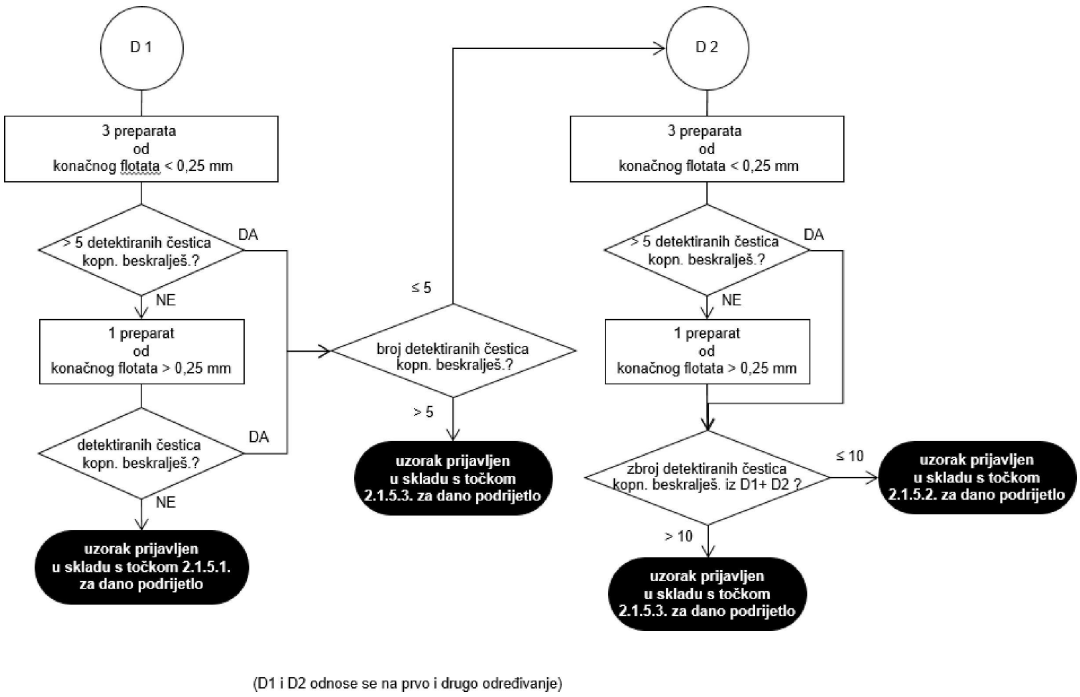
Dijagram toka pregleda nakon jednostruke sedimentacije TCE-om za detekciju životinjskih čestica osim čestica kopnenih beskralješnjaka u krmnim smjesama, krmivima i premiksima za drugo određivanje



(D1 i D2 odnose se na prvo i drugo određivanje; [a]: kopneni kralježnjaci, ribe)

Dijagram 3.

Dijagram toka pregleda nakon dvostruke sedimentacije PE/TCE-om za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka u krmnoj smjesi, krmivima i premiksima



(D1 i D2 odnose se na prvo i drugo određivanje)

2.1.4.3. Broj određivanja

Određivanja se provode na različitim poduzorcima od po 50 g.

Ako nakon prvog određivanja provedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanim u dijagramima 1. ili 3. nisu detektirane životinjske čestice, nije potrebno provesti dodatno određivanje, a o rezultatima analize potrebno je izvijestiti korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.1.

Ako se nakon prvog određivanja provedenog u skladu s dijagramom toka pregleda iz dijagrama 1. utvrdi jedna ili više životinjskih čestica danog podrijetla (tj. od kopnenih kralješnjaka ili ribe), a podrijetlo pronađenih čestica potvrđuje prijavljeni sadržaj uzorka, nije potrebno provesti drugo određivanje. Ako je broj životinjskih čestica danog podrijetla detektiranih tijekom tog prvog određivanja veći od 5, o rezultatima analize potrebno je izvijestiti po vrsti životinje korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.3. Inače je o rezultatima analize potrebno izvijestiti po vrsti životinje korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.2.

Ako se nakon prvog određivanja provedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanim u dijagramu 3. utvrdi više od pet čestica kopnenih beskralješnjaka, nije potrebno drugo određivanje i rezultat analize za to podrijetlo prijavljuje se u skladu s formulacijom iz točke 2.1.5.3.

U drugim slučajevima, ako laboratoriju nije dostavljena deklaracija sadržaja, provodi se drugo određivanje na temelju novog poduzorka. Ako je, nakon drugog određivanja provedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanim u dijagramima 2. odnosno 3. zbroj životinjskih čestica danog podrijetla detektiranih u dva određivanja veći od 10, o rezultatima analize potrebno je izvijestiti po životinjskom podrijetlu korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.3. Inače je o rezultatima analize potrebno izvijestiti po vrsti životinje korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.2.

2.1.5. *Prikaz rezultata*

Pri izvješćivanju o rezultatima, laboratorij mora navesti na kojoj vrsti materijala je provedena analiza (talog, flotat, konačni flotat ili sirovina). U izvješću se jasno navodi koliko je određivanja provedeno i je li prije pripreme preparata provedeno prosijavanje frakcija u skladu s točkom 2.1.3.4.3., trećim stavkom, prvom alinejom ili točkom 2.1.3.4.4. trećom alinejom.

Laboratorijsko izvješće mora sadržavati barem informacije o prisutnosti sastojaka podrijetlom od kopnenih kralješnjaka ili ribe.

O različitim slučajevima izvješćuje se na sljedeće načine.

2.1.5.1. Nije detektirana nijedna čestica danog podrijetla:

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije detektirana prisutnost čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka.”

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije detektirana prisutnost čestica podrijetlom od ribe.”

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije detektirana prisutnost čestica podrijetlom od kopnenih beskralješnjaka.”

2.1.5.2. Pri provedbi samo jednog određivanja detektirano je od 1 do 5 životinjskih čestica danog podrijetla ili pri provedbi dvaju određivanja detektirano je od 1 do 10 čestica danog podrijetla (broj detektiranih čestica manji je od praga utvrđenog u standardiziranim operativnim postupcima (SOP) koje je utvrdio referentni laboratorij EU-a za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP) i objavio na svojim internetskim stranicama):

Ako je provedeno samo jedno određivanje:

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 5 čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka. Čestice su identificirane kao … [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 5 čestica podrijetlom od ribe. Čestice su identificirane kao … [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”

Ako su provedena dva određivanja:

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva određivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 10 čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka. Čestice su identificirane kao … [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva određivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 10 čestica podrijetlom od ribe. Čestice su identificirane kao … [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva određivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 10 čestica podrijetlom od kopnenih beskralješnjaka. Čestice su identificirane kao... [kutikularni fragmenti, dijelovi usne šupljine, mišići, trahealne strukture, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”

Dodatno:

— U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvješću mora biti navedeno u kojoj su frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) utvrđene životinjske čestice, jer detekcija životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak okolišnog zagađenja.

— Ako se detektiraju samo životinjske čestice koje se ne mogu kategorizirati kao čestice podrijetlom od kopnenih kralješnjaka ili ribe (npr. mišićna vlakna), u izvješću se navodi da su detektirane samo takve životinjske čestice i da se ne može isključiti da potječu od kopnenih kralješnjaka.

2.1.5.3. Pri provedbi samo jednog određivanja utvrđeno je više od 5 životinjskih čestica danog podrijetla ili je pri provedbi dvaju određivanja detektirano više od 10 čestica danog podrijetla:

Ako je provedeno samo jedno određivanje:

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 5 čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka. Čestice su identificirane kao … [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navedite ono što odgovara)].”

— „Koliko je bilo moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 5 čestica podrijetlom od ribe. Čestice su identificirane kao … [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge, ostalo (navedite ono što odgovara)].”

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 5 čestica podrijetlom od kopnenih beskralješnjaka. Čestice su identificirane kao... [kutikularni fragmenti, dijelovi usne šupljine, mišići, trahealne strukture, ostalo (navedite ono što odgovara)].”

Ako su provedena dva određivanja:

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva utvrđivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 10 čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka. Čestice su identificirane kao … [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navedite ono što odgovara)].”

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva utvrđivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 10 čestica podrijetlom od ribe. Čestice su identificirane kao … [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge, ostalo (navedite ono što odgovara)].”

— „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva određivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 10 čestica podrijetlom od kopnenih beskralješnjaka. Čestice su identificirane kao... [kutikularni fragmenti, dijelovi usne šupljine, mišići, trahealne strukture, ostalo (navedite ono što odgovara)].”

Dodatno:

— U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvješću mora biti navedeno u kojoj su frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) detektirane životinjske čestice, jer detekcija životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak okolišnog zagađenja.

— Ako se detektiraju samo životinjske čestice koje se ne mogu kategorizirati kao čestice podrijetlom od kopnenih kralješnjaka ili ribe (npr. mišićna vlakna), u izvješću se navodi da su otkrivene samo takve životinjske čestice i da se ne može isključiti da potječu od kopnenih kralješnjaka.”