РЕГЛАМЕНТ (ЕС) № 51/2013 НА КОМИСИЯТА

от 16 януари 2013 година

за изменение на Регламент (ЕО) № 152/2009 по отношение на методите за анализ за определянето на съставки от животински произход за целите на официалния контрол на фуражите

(текст от значение за ЕИП)

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Регламент (ЕО) № 882/2004 на Европейския парламент и на Съвета от 29 април 2004 г. относно официалния контрол, провеждан с цел осигуряване на проверка на съответствието със законодателството в областта на фуражите и храните и правилата за опазване здравето на животните и хуманното отношение към животните ([1]), и по-специално член 11, параграф 4 от него,

като има предвид, че:

(1) В член 7, параграф 1 от Регламент (ЕО) № 999/2001 на Европейския парламент и на Съвета от 22 май 2001 г. относно определяне на правила за превенция, контрол и ликвидиране на някои трансмисивни спонгиформни енцефалопатии ([2]) се забранява храненето на преживни животни с протеини, добити от животни. В обхвата на тази забрана се включват и животни, различни от преживните, а по отношение на храненето на тези животни с продукти от животински произход обхватът на забраната се ограничава в съответствие с приложение IV към посочения регламент.

(2) В член 11, параграф 1 от Регламент (ЕО) № 1069/2009 на Европейския парламент и на Съвета от 21 октомври 2009 г. за установяване на здравни правила относно странични животински продукти и производни продукти, непредназначени за консумация от човека и за отмяна на Регламент (ЕО) № 1774/2002 ([3]) се забранява храненето на сухоземни животни от даден вид, различни от животните с ценна кожа, с преработени животински протеини, получени от тела или части от тялото на животни от същия вид, както и храненето на риба, отглеждана в развъдници, с преработени животински протеини, получени от тялото или части от тялото на отглеждана в развъдници риба от същия вид.

(3) В приложение VI към Регламент (ЕО) № 152/2009 на Комисията от 27 януари 2009 г. за определяне на методите за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на фуражите ([4]) се определят методи за анализ за определянето на съставки от животински произход за целите на официалния контрол на фуражите. Чрез микроскопския метод, който в момента е единственият валидиран метод за откриване наличието на животински протеини във фуражите, е възможно получените от сухоземни животни съставки да бъдат разграничени от съставките, получени от риба, но не може да се определи с достатъчна степен на точност количеството животински съставки във фуражите, поради което този метод не трябва да се използва за тази цел.

(4) Референтната лаборатория на ЕС за животински протеини в хранителните смески валидира нов метод за откриване наличието на съставки от животински произход във фуражите, който се основава на полимеразна верижна реакция (PCR). Според проучването за приложимост на метода, в което участваха националните референтни лаборатории на държавите членки, този нов метод е достатъчно надежден, за да бъде използван като официален метод за контрол в Съюза. Характеристиките му позволяват не само да се открие наличие на съставки от животински произход във фуражите, но също така да бъдат установени животинските видове, от които са тези съставки. Използването на новия метод в съчетание с микроскопския метод или като негова алтернатива в зависимост от случая би допринесло в голяма степен за контрола на правилното прилагане на забраните, въведени по отношение на храненето на животни с Регламент (ЕО) № 999/2001 и Регламент (ЕО) № 1069/2009.

(5) Поради това приложение VI към Регламент (ЕО) № 152/2009 следва да бъде заменено.

(6) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по хранителната верига и здравето на животните и не бяха обект на възражение нито от страна на Европейския парламент, нито от страна на Съвета,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

Приложение VI към Регламент (ЕО) № 152/2009 се заменя с текста на приложението към настоящия регламент.

([1]) ОВ L 165, 30.4.2004 г., стр. 1.
([2]) ОВ L 147, 31.5.2001 г., стр. 1.
([3]) ОВ L 300, 14.11.2009, стр. 1.
([4]) ОВ L 54, 26.2.2009 г., стр. 1.

Член 2

Настоящият регламент влиза в сила на двадесетия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави членки.

Съставено в Брюксел на 16 януари 2013 година.

За Комисията

Председател

José Manuel BARROSO

ПРИЛОЖЕНИЕ

„ПРИЛОЖЕНИЕ VI

МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА СЪСТАВКИ ОТ ЖИВОТИНСКИ ПРОИЗХОД ЗА ЦЕЛИТЕ НА ОФИЦИАЛНИЯ КОНТРОЛ НА ФУРАЖИТЕ

1. ЦЕЛ И ОБХВАТ

Определянето на съставките от животински произход във фуражите се извършва, като се използва наблюдение със светлинен микроскоп или полимеразна верижна реакция (PCR) в съответствие с разпоредбите, предвидени в настоящото приложение.

Тези два метода дават възможност да се установи наличието на съставки от животински произход във фуражните суровини и комбинираните фуражи. Чрез тях обаче не може да се изчисли количеството на тези съставки във фуражните суровини и комбинираните фуражи. И при двата метода границата на откриване е под 0,1 % (w/w).

Методът чрез PCR позволява да бъде установена таксономичната група, към която принадлежат съставките от животински произход във фуражните суровини и комбинираните фуражи.

Тези методи се прилагат за контрол на прилагането на забраните, посочени в член 7, параграф 1 и приложение IV към Регламент (ЕО) № 999/2001 и в член 11, параграф 1 от Регламент (ЕО) № 1069/2009.

В зависимост от вида на изпитвания фураж тези методи могат да бъдат използвани в рамките на един и същ оперативен протокол както самостоятелно, така и заедно в съответствие със стандартните оперативни процедури (СОП), определени от референтната лаборатория на ЕС за животински протеини в хранителните смески (EURL-AP) и публикувани на нейната интернет страница ([1]).

2. МЕТОДИ

2.1. **Светлинна микроскопия**

2.1.1. *Принцип*

Наличието на съставки от животински произход, които могат да бъдат открити в подложените на анализ фуражни суровини и комбинирани фуражи, се определя въз основа на типични характеристики, които се установяват чрез наблюдение под микроскоп, като например мускулни влакна и други месни частици, хрущяли, кости, рога, косми, четина, кръв, пера, черупки от яйца, рибешки кости и люспи.

2.1.2. *Реагенти и апаратура*

2.1.2.1. Реагенти

2.1.2.1.1. Концентриращи средства

2.1.2.1.1.1. Тетрахлоретилен (относителна плътност 1,62)

2.1.2.1.2. Оцветяващи реагенти

2.1.2.1.2.1. Разтвор на ализариново червено (в 100 ml вода се разтварят 2,5 ml солна киселина 1M и към този разтвор се прибавят 200 mg ализариново червено)

2.1.2.1.3. Средства за фиксиране

2.1.2.1.3.1. Основа (NaOH 2,5 % w/v или KOH 2,5 % w/v)

2.1.2.1.3.2. Глицерол (неразреден, вискозитет: 1 490 cP)

2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (вискозитет: 1 200 cP) или смола с равностойни свойства за подготовка на предметно стъкло за постоянна употреба

2.1.2.1.4. Средства за фиксиране с оцветяващи свойства

2.1.2.1.4.1. Разтвор на Лугол (2 g калиев йодид се разтварят в 100 ml вода и се прибавя 1 g йод, като се разклаща често)

([1]) http://eurl.craw.eu/

2.1.2.1.4.2. Цистинов реактив (2 g оловен ацетат, 10 g NaOH на 100 ml вода)

2.1.2.1.4.3. Реактив на Фелинг (приготвен предварително от равни части (1/1) от два основни разтвора А и Б. Разтвор А: 6,9 g меден (II) сулфат пентахидрат се разтварят в 100 ml вода. Разтвор Б: 34,6 g натриев калиев тартарат тетрахидрат и 12 g NaOH се разтварят в 100 ml вода)

2.1.2.1.4.4. тетраметилбензидин/водороден прекис 1 g 3,3',5,5' тетраметилбензидин (TMB) се разтварят в 100 ml безводна оцетна киселина и 150 ml вода. Преди употреба 4 части от така приготвения разтвор на TMB се смесват с 1 част трипроцентен водороден прекис.

2.1.2.1.5. Промиващи средства

2.1.2.1.5.1. Етанол ≥ 96 % (технически чист)

2.1.2.1.5.2. Ацетон (технически чист)

2.1.2.1.6. Избелващ реагент

2.1.2.1.6.1. Готов разтвор на натриев хипохлорит (9—14 % активен хлор)

2.1.2.2. Апаратура

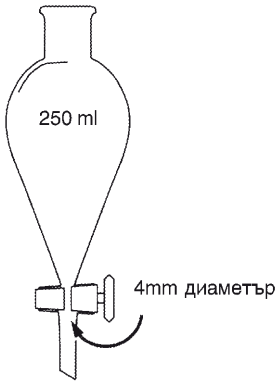
2.1.2.2.1. Аналитична везна с точност до 0,001 g

2.1.2.2.2. Апаратура за смилане: мелничка или хаванче

2.1.2.2.3. Сита с квадратни отвори с ширина на отвора 0,25 mm и 1 mm

2.1.2.2.4. Конусовидна стъклена делителна фуния с вместимост 250 ml с тефлонов или стъклен спирателен кран в основата на конуса. Диаметърът на отваряне на крана следва да бъде ≥ 4 mm. Възможно е да се използва също така и бехерова чаша с конично дъно за утаяване, при условие че лабораторията е доказала, че нивата на откриване са еквивалентни на тези, получени при използване на конусовидна стъклена делителна фуния.

Делителна фуния



2.1.2.2.5. Стереомикроскоп с обхват на общото увеличение най-малко 6,5× до 40×.

2.1.2.2.6. Съставен микроскоп с обхват на общото увеличение най-малко 100× до 400× с преминаваща светлина и светло поле. В допълнение могат да бъдат използвани поляризирана светлина и диференциален интерферентен контраст.

2.1.2.2.7. Стандартна лабораторна стъклария

2.1.2.2.8. Апаратура за подготовка на предметно стъкло: класически микроскопски предметни стъкла, предметни стъкла с ямка, покривни стъкла (20×20 mm), щипци, фини шпатули

2.1.3. *Вземане на проби и подготовка на пробите*

2.1.3.1. Вземане на проби

Използват се представителни проби, взети в съответствие с разпоредбите в приложение I.

2.1.3.2. Необходими предпазни мерки

С цел да се избегне кръстосано замърсяване в лабораториите апаратурата за многократно ползване се почиства внимателно преди употреба. Преди почистването частите на делителните фунии се демонтират. Частите на делителните фунии и лабораторната стъклария се измиват предварително на ръка, а след това и машинно. Ситата се почистват с помощта на четка с твърд синтетичен косъм. Препоръчва се след пресяването на мастни вещества, като рибно брашно например, ситата да бъдат почиствани окончателно с ацетон и сгъстен въздух.

2.1.3.3. Подготовка на проби, различни от мазнини или масла

2.1.3.3.1. Сушене на проба: пробите със съдържание на влага над 14 % се подлагат на предварително сушене.

2.1.3.3.2. Предварително пресяване на проба: препоръчва се гранулираните фуражи и зърната да се пресяват предварително през сито с размер на отвора 1 mm, като двете получени в резултат фракции впоследствие се подготвят и анализират като отделни проби.

2.1.3.3.3. Разделяне на пробата на части и смилане: най-малко 50 g от пробата се отделят като част от пробата за целите на анализа, като впоследствие тя се смила.

2.1.3.3.4. Екстракция и подготовка на утайка: 10 g (с точност до 0,01 g) от смляната част от пробата се прехвърля в делителна фуния или бехерова чаша с конично дъно за утаяване и се добавят 50 ml тетрахлоретилен. Частта, която се прехвърля във фунията, е най-много 3 g за рибно брашно или други чисти животински продукти, минерални съставки или премикси, които образуват повече от 10 % утайка. Сместа се разклаща енергично в продължение на поне 30 секунди и внимателно се добавят още поне 50 ml тетрахлоретилен, като същевременно вътрешната повърхност на фунията внимателно се облива, за да бъдат отмити полепналите частици. Така получената смес се оставя да престои най-малко 5 минути, преди утайката да се отдели чрез отваряне на спирателния кран.

Ако се използва бехерова чаша с конично дъно за утаяване, сместа се разбърква енергично в продължение на поне 15 секунди, като всички частици по стените на бехеровата чаша се отмиват внимателно от вътрешната повърхност с най-малко 10 ml чист тетрахлоретилен. Сместа се оставя да престои в продължение на 3 минути, след което се разбърква отново за 15 секунди, като всички частици по стените на бехеровата чаша се отмиват внимателно от вътрешната повърхност с най-малко 10 ml чист тетрахлоретилен. Така получената смес се оставя да престои в продължение на най-малко 5 минути, като след това течната фракция се отстранява и изхвърля чрез внимателно преливане, като се внимава да няма загуба на утайка.

Утайката се изсушава и след това се претегля (с точност до 0,001 g). Ако над 5 % от утайката се състои от частици > 0,50 mm, тя се пресява през сито с големина на отвора 0,25 mm, като се изследват и двете получени по този начин фракции.

2.1.3.3.5. Екстракция и подготовка на плаваща фракция: след възстановяването на утайката чрез описания по-горе метод в делителната фуния остават две фази: течна фаза, състояща се от тетрахлоретилен, и твърда фаза, състояща се от плаващ на повърхността слой. Тази твърда фаза представлява плаваща фракция и нейното възстановяване се извършва, като цялото количество тетрахлоретилен се излее от фунията с отварянето на спирателния кран. Чрез обръщане на делителната фуния плаващата фракция се прехвърля в голямо блюдо Петри и се изсушава чрез въздух във вентилационен шкаф. Ако над 5 % от плаващата фракция се състои от частици > 0,50 mm, тя се пресява през сито с големина на отвора 0,25 mm, като се изследват и двете получени по този начин фракции.

2.1.3.3.6. Подготовка на суровина: извършва се подготовка на най-малко 5 g от отделената и смляна част от пробата. Ако над 5 % от веществото се състои от частици > 0,50 mm, то се пресява през сито с големина на отвора 0,25 mm, като се изследват и двете получени по този начин фракции.

2.1.3.4. Подготовка на проби, които се състоят от мазнини или масла

Подготовката на проби, които се състоят от мазнини или масла, се извършва съгласно следния протокол:

— ако мазнината е твърда, тя се загрява в пещ до втечняването ѝ,

— с помощта на пипета 40 ml от мазнината или маслото се прехвърлят от дъното на пробата в епруветка за центрофугиране,

— центрофугира се в продължение на 10 минути при 4 000 rpm,

— ако след центрофугирането мазнината е твърда, тя се загрява в пещ до втечняването ѝ,

— центрофугира се отново в продължение на 5 минути при 4 000 rpm,

— с помощта на малка лъжичка или шпатула половината от отделените примеси се прехвърлят на микроскопски предметни стъкла с цел анализ, като за фиксиращо средство се препоръчва използването на глицерол,

— останалите примеси се използват за подготовка на утайката съгласно точка 2.1.3.3.

2.1.3.5. Използване на оцветяващи реагенти

С цел улесняване на правилното определяне на съставките от животински произход, при подготовката на пробите извършващият анализа може да използва оцветяващи реагенти в съответствие с насоките, определени от EURL-AP и публикувани на нейната интернет страница.

Когато за оцветяване на утайката се използва ализариново червено, се прилага следният протокол:

— изсушената утайка се прехвърля в стъклена епруветка и се изплаква два пъти с около 5 ml етанол (всеки път се използва вихров смесител в продължение на 30 секунди, разтворителят се оставя да се утаи за около 1 минута и 30 секунди, след което се излива),

— утайката се избелва, като се добавя най-малко 1 ml разтвор на натриев хипохлорит. Реакцията се оставя да протече в продължение на 10 минути. Епруветката се напълва с вода, утайката се оставя да се утаи за 2—3 минути, след което водата и отделените частици се изливат внимателно,

— утайката се промива още два пъти с около 10 ml вода (използва се вихров смесител за 30 секунди, оставя се да се утаи, водата се излива всеки път),

— добавят се 2 до 10 капки от разтвора на ализариново червено и сместа се разбърква с помощта на вихров смесител. Реакцията се оставя да протече в продължение на 30 секунди и оцветената утайка се промива два пъти с около 5 ml етанол, след което се изплаква още веднъж с ацетон (всеки път се използва вихров смесител в продължение на 30 секунди, разтворителят се оставя да се утаи за около 1 минута, след което се излива),

— оцветената утайка се изсушава.

2.1.4. *Микроскопско изследване*

2.1.4.1. Подготовка на предметно стъкло

Микроскопските предметни стъкла се подготвят от утайката и, в зависимост от решението на извършващия анализа, от плаващата фракция или суровината. Ако при подготовката на пробите е използвано пресяване, подготовка се извършва и за двете получени фракции (ситна фракция и едра фракция). Пробите за анализ, отделени от нанесените върху предметни стъкла фракции, се считат за представителни по отношение на цялата фракция.

Необходимо е да бъдат подготвени достатъчен брой предметни стъкла, за да се осигури възможност за цялостен протокол на изследването съгласно точка 2.1.4.2.

Микроскопските предметни стъкла се фиксират с подходящи средства за фиксиране в съответствие със СОП, установени от EURL-AP и публикувани на нейната интернет страница. Предметните стъкла се покриват с покривни стъкла.

2.1.4.2. Протоколи за наблюдение за откриване на частици от животински произход в комбинираните фуражи и фуражните суровини

Подготвените микроскопски предметни стъкла се наблюдават в съответствие с протоколите за наблюдение, илюстрирани на диаграма 1 за комбинираните фуражи и фуражните суровини, различни от чистото рибно брашно, или на диаграма 2 за чистото рибно брашно.

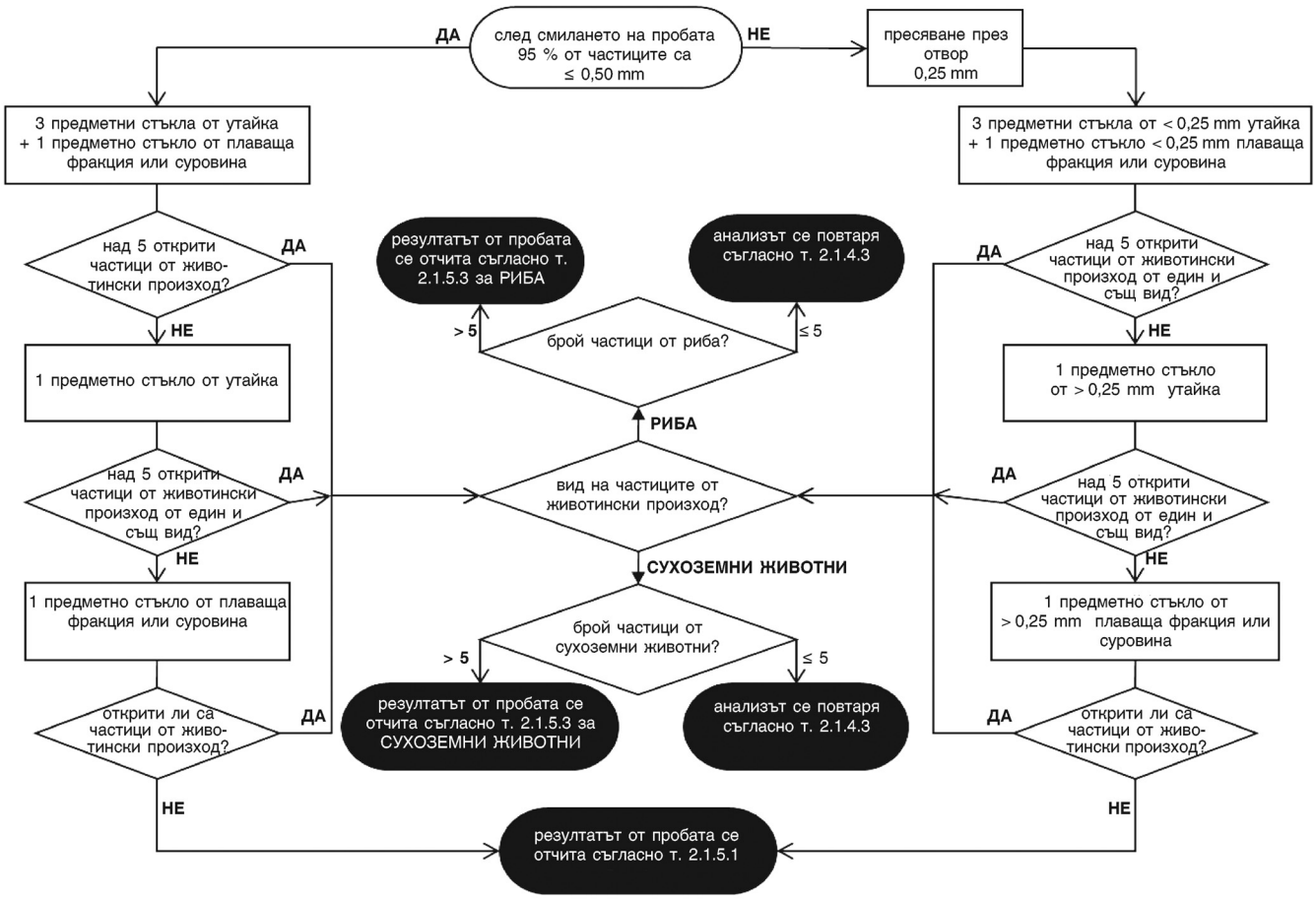
Микроскопските наблюдения се извършват, като се използва съставен микроскоп за утайката и, в зависимост от решението на извършващия анализа, за плаващата фракция или за суровината. В допълнение към съставния микроскоп за едрите фракции може да се използва и стереомикроскоп. Всяко предметно стъкло се изследва цялостно при различни степени на увеличение.

Минималният брой предметни стъкла, които трябва да бъдат наблюдавани при всеки от установените в протокола за наблюдение етапи, следва да се спазва стриктно, освен ако не е възможно необходимият брой предметни стъкла да бъде осигурен с помощта на веществото в цялата фракция. При всяко определяне се наблюдават максимум 6 предметни стъкла.

За да се улесни определянето на вида и произхода на частиците, извършващият анализа може да използва помощни средства, като например системи за подпомагане вземането на решения, бази данни с изображения и еталонни проби.

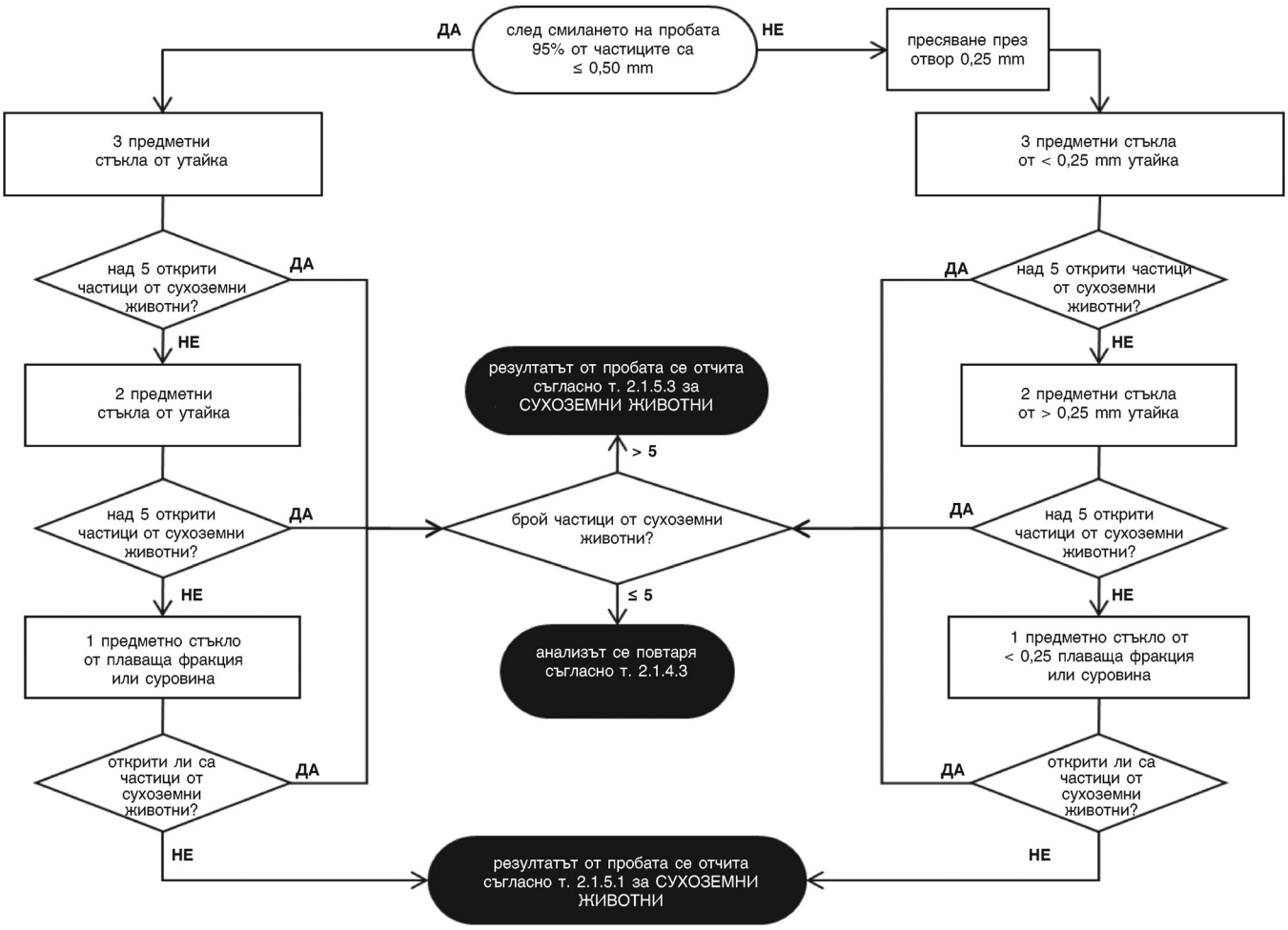
Диаграма 1

Протокол за наблюдение за откриване на частици от животински произход в комбинирани фуражи и фуражни суровини, различни от рибно брашно



Диаграма 2

Протокол за наблюдение за откриване на частици от животински произход в рибно брашно



2.1.4.3. Брой на определянията

Ако след първото определяне, проведено в съответствие с протоколите за наблюдение, изобразени на диаграма 1 или диаграма 2 в зависимост от случая, не е установено наличие на частици от животински произход от определен вид (т.е. сухоземни животни или риба), не е необходимо да се провежда допълнително определяне и резултатът от анализа се отчита, като се използва формулировката, посочена в точка 2.1.5.1.

Ако след първото определяне, проведено в съответствие с протоколите за наблюдение, изобразени на диаграма 1 или диаграма 2 в зависимост от случая, общият брой на установените частици от животински произход от определен вид (т.е. сухоземни животни или риба) е между 1 и 5, е необходимо да бъде извършено второ определяне за нова част от пробата (50 g). Ако след второто определяне броят на установените частици от животински произход от конкретния вид е между 0 и 5, резултатът от анализа се отчита, като се използва формулировката, посочена в точка 2.1.5.2; в противен случай се провежда трето определяне за нова част от пробата (50 g). Ако обаче след първото и второто определяне сумата от частиците от даден вид, установени при двете определяния, е над 15, не е необходимо допълнително определяне и резултатът от анализа се отчита, като се използва формулировката, посочена в точка 2.1.5.3. Ако след третото определяне сумата от частиците от животински произход от даден вид, установени при трите определяния, е над 15, резултатът от анализа се отчита, като се използва формулировката, посочена в точка 2.1.5.3. В противен случай резултатът от анализа се отчита, като се използва формулировката, посочена в точка 2.1.5.2.

Ако след първото определяне, проведено в съответствие с протоколите за наблюдение, изобразени на диаграма 1 или диаграма 2 в зависимост от случая, е установено наличие на повече от 5 частици от животински произход от определен вид (т.е. сухоземни животни или риба), резултатът от анализа се отчита, като се използва формулировката, посочена в точка 2.1.5.3.

2.1.5. *Отчитане на резултатите*

При отчитането на резултатите лабораторията посочва вида на използвания при анализа материал (утайка, плаваща фракция или суровина), както и броя на извършените определяния.

Лабораторният доклад съдържа най-малко информация относно наличието на съставки, получени от сухоземни животни и риба.

Отделните случаи се представят по следния начин:

2.1.5.1. Не е установено наличие на частици от животински произход от определен вид

— доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в разглежданата проба не се откриват частици, получени от сухоземни животни,

— доколкото може да се види под светлинен микроскоп, в разглежданата проба не се откриват частици, получени от риба.

2.1.5.2. Установено е наличие на средно 1 до 5 частици от животински произход от даден вид

— доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при всяко определяне на разглежданата проба се откриват средно не повече от 5 частици, получени от сухоземни животни. Установените частици са от … [кости, хрущяли, мускули, косми, рога …]. Тази ниска степен на наличие на частици е под границата на откриване на микроскопския метод, което означава, че не може да бъде изключен риск от грешен положителен резултат.

Или, в зависимост от случая,

— доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при всяко определяне на разглежданата проба се откриват средно не повече от 5 частици, получени от риба. Установените частици са от … [рибешки кости, рибешки люспи, хрущяли, мускули, отолити, хриле …]. Тази ниска степен на наличие на частици е под границата на откриване на микроскопския метод, което означава, че не може да бъде изключен риск от грешен положителен резултат.

Когато е използвано предварително пресяване на пробата, в лабораторния доклад се посочва в коя фракция (пресятата фракция, гранулираната фракция или зърната) са установени частиците от животински произход, доколкото откриването им само в пресятата фракция би могло да означава замърсяване на обкръжаващата среда.

2.1.5.3. Установено е наличие на средно над 5 частици от животински произход от даден вид

— доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при всяко определяне на разглежданата проба се откриват средно над 5 частици, получени от сухоземни животни. Установените частици са от … [кости, хрущяли, мускули, косми, рога …].

Или, в зависимост от случая,

— доколкото може да се види под светлинен микроскоп, при всяко определяне на разглежданата проба се откриват средно над 5 частици, получени от риба. Установените частици са от … [рибешки кости, рибешки люспи, хрущяли, мускули, отолити, хриле …].

Когато е използвано предварително пресяване на пробата, в лабораторния доклад се посочва в коя фракция (пресятата фракция, гранулираната фракция или зърната) са установени частиците от животински произход, доколкото откриването им само в пресятата фракция би могло да означава замърсяване на обкръжаващата среда.

2.2. **Полимеразна верижна реакция (PCR)**

2.2.1. *Принцип*

Фрагментите от дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК) от животински произход, които е възможно да се намират във фуражните суровини и комбинираните фуражи, се откриват посредством техника за генетична амплификация чрез полимеразна верижна реакция (PCR), насочена към секвенции на ДНК, които са специфични за конкретен животински вид.

При метода чрез PCR е необходимо най-напред да бъде извършено извличане на ДНК. На следващия етап извлечената ДНК се подлага на амплификация с цел да бъдат установени животинските видове, предмет на анализа.

2.2.2. *Реагенти и апаратура*

2.2.2.1. Реагенти

2.2.2.1.1. Реагенти при фазата на извличане на ДНК

Следва да бъдат използвани единствено реагенти, които са одобрени от EURL-AP и са публикувани на нейната интернет страница.

2.2.2.1.2. Реагенти при фазата на генетична амплификация

2.2.2.1.2.1. Праймери и сонди

Следва да се използват единствено праймери и сонди със секвенции на олигонуклеотиди, които са валидирани от EURL-AP ([1]).

2.2.2.1.2.2. Реактивни смеси (Master Mix)

Следва да бъдат използвани само разтвори на реактивни смеси, в чийто състав липсват реагенти, които биха могли да доведат до грешни резултати поради присъствие на животинска ДНК ([2]).

2.2.2.1.2.3. Реагенти за обеззаразяване

2.2.2.1.2.3.1. Разтвор на солна киселина (0,1N)

2.2.2.1.2.3.2. Избелване (разтвор на натриев хипохлорит при 0,15 % активен хлор)

2.2.2.1.2.3.3. Некорозивни химични реагенти за обеззаразяване на скъпа апаратура, като аналитични везни (например DNA Erase™ на MP Biomedicals)

2.2.2.2. Апаратура

2.2.2.2.1. Аналитична везна с точност до 0,001 g

2.2.2.2.2. Апаратура за смилане

2.2.2.2.3. Термоциклично устройство, позволяващо извършване на PCR в реално време

2.2.2.2.4. Микроцентрофуга за микроцентрофужни епруветки

2.2.2.2.5. Набор от микропипети, позволяващи пипетиране от 1 µl до 1 000 µl

2.2.2.2.6. Стандартни пластмасови консумативи за молекулярна биология: микроцентрофужни епруветки, пластмасови накрайници с филтър за микропипети, лабораторни плаки, подходящи за термоциклично устройство.

2.2.2.2.7. Фризери за съхранение на проби и реагенти

([1]) Списъкът с тези праймери и сонди за всеки от животинските видове, предмет на анализ, е на разположение на интернет страницата на EURL-AP.

([2]) Примери за използвани реактивни смеси са публикувани на интернет страницата на EURL-AP.

2.2.3. *Вземане на проби и подготовка на пробите*

2.2.3.1. Вземане на проби

Използват се представителни проби, взети в съответствие с разпоредбите в приложение I.

2.2.3.2. Подготовка на пробите

Подготовката на лабораторните проби до момента на извличането на ДНК се осъществява в съответствие с изискванията, посочени в приложение II. Най-малко 50 g от пробата се отделят като част от пробата за целите на анализа, като впоследствие тя се смила.

Подготовката на пробите се извършва в помещения, различни от предназначените за извличане на ДНК и за реакции за генетична амплификация съгласно стандарт ISO 24276.

Подготвят се две проби за анализ, като всяка от тях е поне 100 mg.

2.2.4. *Извличане на ДНК*

Извличането на ДНК се извършва от всяка подготвена проба за анализ в съответствие със СОП, определени от EURL-AP и публикувани на нейната интернет страница.

За всяка серия по извличане се подготвят по две контролни проби на извличането съгласно стандарт ISO 24276.

— празна контролна проба за извличане,

— положителна контролна проба за извличане на ДНК.

2.2.5. *Генетична амплификация*

Генетичната амплификация се извършва, като се използват валидираните методи за всеки от животинските видове, за които се изисква идентификация. Тези методи са установени в СОП, определени от EURL-AP и публикувани на нейната интернет страница. Всяка извлечена ДНК се анализира при най-малко две различни разреждания, за да се прецени наличието на инхибиране.

Подготвят се две контролни проби на амплификацията за всеки изследван животински вид съгласно стандарт ISO 24276.

— за всяка плака или серия от PCR анализи се извършва положителна контролна проба за ДНК от изследвания животински вид,

— за всяка плака или серия от PCR анализи се извършва контролна проба на реагентите при амплификация (наричана още контролна без матрица).

2.2.6. *Тълкуване и отчитане на резултатите*

При отчитането на резултатите лабораторията посочва информация най-малко относно теглото на използваните проби за анализ, използваната техника за извличане, броя на извършените определяния, както и относно границата на откриване на метода.

Резултатите не следва да се тълкуват и докладват, ако положителната контролна проба за извличане на ДНК и положителната контролна проба за ДНК от изследвания животински вид не дават положителни резултати по отношение на изследвания животински вид, а контролната проба на реагентите при амплификация е отрицателна.

В случай че е налице несъответствие между резултатите от двете проби за анализ, е необходимо повторно извършване най-малко на фазата на генетична амплификация. В случай на опасения от страна на лабораторията, че екстрактите на ДНК могат да са причина за несъответствието, преди да се пристъпи към тълкуване на резултатите, е необходимо да се извърши ново извличане на ДНК и последваща генетична амплификация.

Окончателното отчитане на резултатите следва да бъде извършено чрез обединяване и тълкуване на резултатите от двете проби за анализ в съответствие със СОП, определени от EURL-AP и публикувани на нейната интернет страница.

2.2.6.1. Отрицателен резултат

Отрицателният резултат се отчита по следния начин:

В разглежданата проба не бе установено наличие на ДНК от X (X — животинските видове или групата от животински видове, предмет на анализа).

2.2.6.2. Положителен резултат

Положителният резултат се отчита по следния начин:

В разглежданата проба бе установено наличие на ДНК от X (X — животинските видове или групата от животински видове, предмет на анализа)“.