

## NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 51/2013

zo 16. januára 2013,

**ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 152/2009, pokiaľ ide o metódy analýzy na stanovenie zložiek živočíšneho pôvodu na účely úradných kontrol krmív**

(Text s významom pre EHP)

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 z 29. apríla 2004 o úradných kontrolách uskutočňovaných s cieľom zabezpečiť overenie dodržiavania potravinového a krmivového práva a predpisov o zdraví zvierat a o starostlivosti o zvieratá<sup>(1)</sup>, a najmä na jeho článok 11 ods. 4,

keďže:

- (1) V článku 7 ods. 1 nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 999/2001 z 22. mája 2001, ktorým sa stanovujú pravidlá prevencie, kontroly a eradikácie niektorých prenosných spongiformných encefalopatií (TSE)<sup>(2)</sup>, sa zakazuje kŕmenie prežúvavcov živočíšnymi bielkovinami. Uvedený zákaz sa rozšíril aj na iné zvieratá ako prežúvavce a obmedzil sa, pokiaľ ide o kŕmenie týchto zvierat produktmi živočíšneho pôvodu, v súlade s prílohou IV k uvedenému nariadeniu.
- (2) V článku 11 ods. 1 nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 z 21. októbra 2009, ktorým sa ustanovujú zdravotné predpisy týkajúce sa vedľajších živočíšnych produktov a odvodených produktov neurčených na ľudskú spotrebu a ktorým sa zrušuje nariadenie (ES) č. 1774/2002 z 25. októbra 2002<sup>(3)</sup>, sa zakazuje kŕmenie suchozemských zvierat určitého druhu okrem kožušinových zvierat spracovanou živočíšnou bielkovinou pochádzajúcou z tiel alebo častí tiel zvierat toho istého druhu, ako aj kŕmenie rýb z hospodárskych chovov spracovanou živočíšnou bielkovinou pochádzajúcou z tiel alebo častí tiel rýb z hospodárskych chovov toho istého druhu.
- (3) V nariadení Komisie (ES) č. 152/2009 z 27. januára 2009, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely úradných kontrol krmív<sup>(4)</sup>, sa

v jeho prílohe VI stanovujú metódy analýzy na stanovenie zložiek živočíšneho pôvodu na účely úradných kontrol krmív. Mikroskopická metóda, ktorá je v súčasnosti jedinou validovanou metódou na zisťovanie prítomnosti živočíšnych bielkovín v krmivách, umožňuje rozlíšiť prítomnosť zložiek pochádzajúcich zo suchozemských zvierat od prítomnosti zložiek pochádzajúcich z rýb, avšak neumožňuje s dostatočnou presnosťou kvantifikovať množstvo živočíšnych zložiek v krmivách, a preto by sa na tento účel nemala používať.

- (4) Referenčné laboratórium EÚ pre živočíšne proteíny v krmivách zvalidovalo novú metódu zisťovania živočíšnych zložiek, ktorá je založená na polymerázovej reťazovej reakcii (polymerase chain reaction, PCR). Vykonávacou štúdiou, ktorá prebehla za účasti národných referenčných laboratórií členských štátov, sa preukázalo, že nová metóda je dostatočne robustná, aby sa mohla v Únii používať ako metóda úradnej kontroly. Podľa tejto novej metódy je možné zistiť prítomnosť živočíšnych zložiek v krmivách, ako aj živočíšny druh, z ktorého tieto zložky pochádzajú. Používanie tejto novej metódy v kombinácii s mikroskopickou metódou, prípadne jej nahradenie touto novou metódou, by veľmi prispelo ku kontrole správneho vykonávania zákazov kŕmenia, ktoré sú stanovené v nariadeniach (ES) č. 999/2001 a (ES) č. 1069/2009.
- (5) Príloha VI k nariadeniu (ES) č. 152/2009 by sa preto mala zodpovedajúcim spôsobom zmeniť a doplniť.
- (6) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat a Európsky parlament ani Rada proti nim nevzniesli námietku,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

## Článok 1

Príloha VI k nariadeniu (ES) č. 152/2009 sa nahrádza textom uvedeným v prílohe k tomuto nariadeniu.

(1) Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1.  
(2) Ú. v. ES L 147, 31.5.2001, s. 1.  
(3) Ú. v. EÚ L 300, 14.11.2009, s. 1.  
(4) Ú. v. EÚ L 54, 26.2.2009, s. 1.

*Článok 2*

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dvadsiatym dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 16. januára 2013

*Za Komisiu*  
*predseda*  
José Manuel BARROSO

---

## PRÍLOHA

## „PRÍLOHA VI

**Metódy analýzy na stanovenie zložiek živočíšneho pôvodu na účely úradných kontrol krmív**

## 1. ÚČEL A ROZSAH

Stanovenie zložiek živočíšneho pôvodu v krmivách sa uskutočňuje pomocou svetelnej mikroskopie alebo polymerázovej reťazovej reakcie (polymerase chain reaction, PCR) v súlade s ustanoveniami uvedenými v tejto prílohe.

Tieto dve metódy umožňujú zistiť prítomnosť zložiek živočíšneho pôvodu v krmných surovinách a v krmných zmesiach. Neumožňujú však výpočet množstva takýchto zložiek v krmných surovinách a v krmných zmesiach. Obe metódy majú detekčný limit nižší ako 0,1 % (hmot.).

Metóda PCR umožňuje identifikáciu taxonomickej skupiny zložiek živočíšneho pôvodu, ktoré sú prítomné v krmných surovinách a v krmných zmesiach.

Tieto metódy sa použijú na kontrolu uplatňovania zákazov stanovených v článku 7 ods. 1 a v prílohe IV k nariadeniu (ES) č. 999/2001 a v článku 11 ods. 1 nariadenia (ES) č. 1069/2009.

V závislosti od druhu skúšaného krmiva možno tieto metódy použiť v rámci jedného operačného protokolu, a to buď jednotlivo, alebo vo vzájomnej kombinácii, v súlade so štandardnými operačnými postupmi (standard operating procedures, SOP), ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo Referenčné laboratórium EÚ pre živočíšne proteíny v krmivách (EURL-AP) <sup>(1)</sup>.

## 2. METÓDY

## 2.1. Svetelná mikroskopia

## 2.1.1. Princíp

Zložky živočíšneho pôvodu, ktoré sa môžu vyskytovať v krmných surovinách a v krmných zmesiach, sa zisťujú na základe typických, mikroskopicky identifikovateľných vlastností ako svalové vlákna a iné časti mäsa, chrupavky, kosti, rohovina, srst, štetiny, krv, perie, vaječné škrupiny, rybie kosti a šupiny.

## 2.1.2. Činidlá a prístroje

## 2.1.2.1. Činidlá

## 2.1.2.1.1. Zahusťovacie činidlo

## 2.1.2.1.1.1. Tetrachlóretylén (hustota 1,62)

## 2.1.2.1.2. Vyfarbovacie činidlo

## 2.1.2.1.2.1. Roztok alizarínovej červene (zriedte 2,5 ml 1M kyseliny chlorovodíkovej v 100 ml vody a do tohto roztoku pridajte 200 mg alizarínovej červene)

## 2.1.2.1.3. Preparačné činidlá

## 2.1.2.1.3.1. Lúh (NaOH 2,5 % hm./obj. alebo KOH 2,5 % hm./obj.)

## 2.1.2.1.3.2. Glycerol (neriedený, viskozita: 1 490 cP)

## 2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (viskozita: 1 200 cP) alebo živica s rovnocennými vlastnosťami na prípravu trvalého preparátu

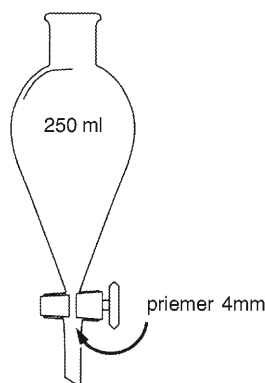
## 2.1.2.1.4. Vyfarbovacie činidlá

## 2.1.2.1.4.1. Lugolov roztok (rozpusťte 2 g jodidu draselného v 100 ml vody a pridajte 1 g jódu za stáleho pretrepávania)

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

- 2.1.2.1.4.2. Cystínové činidlo (2 g octanu olovnatého, 10 g NaOH/100 ml vody)
- 2.1.2.1.4.3. Fehlingovo činidlo (pripravuje sa pred použitím z dvoch rovnako veľkých častí (1/1) z dvoch roztokov A a B. Roztok A: 6,9 g pentahydrátu síranu meďnatého sa rozpustí v 100 ml destilovanej vody. Roztok B: 34,6 g vínanu sodnodraselného tetrahydrátu a 12 g NaOH sa rozpustí v 100 ml destilovanej vody)
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametylbenzidín/peroxid vodíka. (1 g 3,3',5,5' tetrametylbenzidínu sa rozpustí v 100 ml ľadovej kyseliny octovej a v 150 ml vody. Pred použitím zamiešajte 4 diely roztoku tetrametylbenzidínu s 1 dielom 3 %-ného peroxidu vodíka)
- 2.1.2.1.5. Odfarbovacie činidlá
- 2.1.2.1.5.1. Etanol  $\geq 96\%$  (technický)
- 2.1.2.1.5.2. Acetón (technický)
- 2.1.2.1.6. Odfarbovacie činidlo
- 2.1.2.1.6.1. Obchodný roztok chlórnanu sodného (9 – 14 % aktívneho chlóru)
- 2.1.2.2. Vybavenie
- 2.1.2.2.1. Analytická váha s presnosťou 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Mlecie zariadenie: mlynček alebo trecia miska
- 2.1.2.2.3. Sitá so štvorcovými okami so šírkou s rozmermi 0,25 mm a 1 mm
- 2.1.2.2.4. Sklenený kónický oddeľovací lievik s objemom 250 ml s teflónovým alebo skleneným zabrušeným kohútikom na spodku kužeľa. Prierez kohútika v otvorenej polohe je  $\geq 4$  mm. Alternatívne sa môže použiť sklenená kónická sedimentačná kadička, ak laboratórium preukázalo, že hodnoty medznej detekcie zodpovedajú hodnotám získaným pri použití skleneného kónického oddeľovacieho lievika.

Oddeľovací lievik



- 2.1.2.2.5. Stereoskopický mikroskop umožňujúci konečný rozsah zväčšenia minimálne 6,5× až 40×
- 2.1.2.2.6. Kombinovaný mikroskop umožňujúci konečný rozsah zväčšenia minimálne 100× až 400× v jasnom poli prechádzajúceho svetla. Ďalej možno použiť aj polarizované svetlo a diferenciálny interferenčný kontrast.
- 2.1.2.2.7. Bežné laboratórne sklo
- 2.1.2.2.8. Pomôcky na prípravu podložného sklíčka: klasické podložné sklíčka, podložné sklíčka s jamkou, krycie sklíčka (20×20 mm), pínzety, laboratórna špachtlička
- 2.1.3. Odber a príprava vzoriek
- 2.1.3.1. Odber vzoriek
- Používa sa reprezentatívna vzorka odobraná podľa postupov stanovených v prílohe I.

- 2.1.3.2. Preventívne opatrenia, ktoré sa majú prijať
- Všetko vybavenie určené na viacnásobné použitie sa pred použitím dôkladne vyčistí, čím sa zabráni krížovej kontaminácii v laboratóriu. Pred čistením sa oddeľovací lievik rozoberie na jednotlivé časti. Jednotlivé časti oddeľovacieho lievika a skleneného vybavenia sa vopred umyjú ručne a následne sa vložia do umývacieho zariadenia. Sitá sa čistia kefou s pevnými syntetickými štetinami. Po preosiatí materiálu s obsahom tuku, ako je napr. rybia múčka, sa na záver odporúča očistiť sitá acetónom a stlačeným vzduchom.
- 2.1.3.3. Príprava iných vzoriek ako tuky alebo oleje
- 2.1.3.3.1. Sušenie vzoriek: vzorky s obsahom vlhkosti > 14 % sa pred manipuláciou vysušia.
- 2.1.3.3.2. Predbežné preosievanie vzoriek: odporúča sa vopred preosiať granulované a jadrové krmivo sitom s veľkosťou 1 mm a následne pripraviť a analyzovať dve vzniknuté frakcie ako samostatné vzorky.
- 2.1.3.3.3. Odber podvzoriek a mletie: z aspoň 50 g vzorky sa pripraví podvzorky s cieľom vykonať analýzu a následne sa zomelú.
- 2.1.3.3.4. Extrakcia a príprava sedimentu: do oddeľovacieho lievika alebo do kónickej sedimentačnej kadičky sa naváži dávka s hmotnosťou 10 g (s presnosťou na 0,01 g) rozomletej podvzorky a pridá sa aspoň 50 ml tetrachlóretylénu. V prípade rybiej múčky alebo iných výrobkov čisto živočíšneho pôvodu, minerálnych zložiek alebo premixov, ktoré vytvárajú viac ako 10 % sedimentu, sa dávka zníži na 3 g. Zmes sa dôkladne pretrepáva počas aspoň 30 s a v priebehu oplachovania vnútorného povrchu oddeľovacieho lievika na účely odstránenia akýchkoľvek príľnutých pevných častíc sa opatrne pridáva minimálne ďalších 50 ml tetrachlóretylénu. Vzniknutá zmes sa ponechá usadzovať počas aspoň piatich minút, kým sa otvorením kohútika oddelí sediment.
- Ak sa používa kónická sedimentačná kadička, musí sa zmes premiešavať aspoň počas 15 s a všetky pevné častice, ktoré príľnú na stene sedimentačnej kadičky, je nutné z vnútorného povrchu opatrne opláchnuť aspoň 10 ml čistého tetrachlóretylénu. Zmes sa ponechá stáť aspoň počas troch minút a následne sa opäť premieša počas 15 s a všetky pevné častice, ktoré príľnú na stene sedimentačnej kadičky, je nutné z vnútorného povrchu opatrne opláchnuť aspoň 10 ml čistého tetrachlóretylénu. Vzniknutá zmes sa ponechá usadzovať aspoň počas piatich minút a následne sa pomocou dekantácie tekutá frakcia opatrne odstráni a vyleje, pričom sa dbá na to, aby nedošlo k vylitiu sedimentu.
- Sediment sa vysuší a následne odváži (s presnosťou na 0,001 g). Ak viac ako 5 % sedimentu tvoria pevné častice > 0,50 mm, preoseje sa sitom s veľkosťou 0,25 mm a tieto dve vzniknuté frakcie sa zanalyzujú.
- 2.1.3.3.5. Extrakcia a príprava flotátu: po odobratí sedimentu podľa uvedenej metódy by v oddeľovacom lieviku mali zostať dve fázy: tekutá, ktorú tvorí tetrachlóretylén, a pevná, vytvorená z plávajúceho materiálu. Pevnou zložkou je flotát, ktorý je nutné odobrať tak, že sa z lievika otvorením kohútika úplne vypustí tetrachlóretylén. Obrátením oddeľovacieho lievika sa flotát premiestni na veľkú Petriho misku a vysuší sa vzduchom v laboratórnom digestore. Ak viac ako 5 % sedimentu tvoria pevné častice > 0,50 mm, preoseje sa sitom s veľkosťou 0,25 mm a tieto dve vzniknuté frakcie sa zanalyzujú.
- 2.1.3.3.6. Príprava suroviny: pripraví sa dávka aspoň 5 g rozomletej podvzorky. Ak viac ako 5 % materiálu tvoria častice > 0,50 mm, preoseje sa sitom s veľkosťou 0,25 mm a tieto dve vzniknuté frakcie sa zanalyzujú.
- 2.1.3.4. Príprava vzoriek pozostávajúcich z tukov alebo olejov
- Na analýzu vzoriek pozostávajúcich z tukov alebo olejov sa používa tento protokol:
- ak je tuk tuhej konzistencie, ohrieva sa v rúre, kým sa neroztopí,
  - použitím pipety sa odoberie 40 ml tuku alebo oleja zo spodnej časti vzorky a prenesie sa do odstredivkovej skúmavky,
  - odstreďuje sa počas 10 minút pri 4 000 ot/min.,
  - ak je tuk po odstredení tuhý, ohrieva sa v rúre, kým sa neroztopí,
  - opakujte odstreďovanie 5 minút pri otáčkach 4 000 ot/min.,

- pomocou laboratórnej lyžičky alebo špachtle sa polovica dekantovaných nečistôt preniesie na mikroskopické sklíčka na účely rozboru, pričom sa odporúča použiť glycerol ako preparačné činidlo,
- zostávajúce nečistoty sa použijú na prípravu sedimentu podľa bodu 2.1.3.3.

#### 2.1.3.5. Použitie vyfarbovacích činidiel

Osoba vykonávajúca analýzu môže na uľahčenie správnej identifikácie zložiek živočíšneho pôvodu použiť pri príprave vzoriek vyfarbovacie činidlá v súlade s pokynmi, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo Referenčné laboratórium EÚ pre živočíšne proteíny v krmivách (EURL-AP).

Ak sa na zafarbenie sedimentu použije roztok alizarínovej červene, použije sa tento protokol:

- vysušený sediment sa premiestni do sklenenej skúmavky a dvakrát sa vypláchne asi 5 ml etanolu (vždy sa použije počas 30 s magnetické miešadlo, rozpúšťadlo sa nechá usadiť počas 1 min. 30 s a vyleje sa),
- sediment sa vybieli pridaním najmenej 1 ml roztoku hypochloritu sodného. Umožní sa priebeh reakcie počas 10 minút. Skúmavka sa naplní vodou, sediment sa nechá počas dvoch až troch minút usadiť a voda so suspendovanými časticami sa opatrne vyleje,
- sediment sa dvakrát preleje 10 ml destilovanej vody (vždy sa počas 30 s použije magnetické miešadlo, zmes sa nechá usadiť a vyleje sa destilovaná voda),
- pridá sa 2 až 10 kvapiek roztoku alizarínovej červene a zmes sa za použitia magnetického miešadla rozmixuje. Reakcia sa ponechá prebiehať počas 30 s a zafarbený sediment sa dvakrát vypláchne asi 5 ml etanolu a následne jedenkrát acetómom (vždy sa počas 30 s použije magnetické miešadlo, rozpúšťadlo sa nechá usadiť – asi 1 min. – a vyleje sa),
- zafarbený sediment sa vysuší.

#### 2.1.4. Mikroskopické skúmanie

##### 2.1.4.1. Príprava podložných sklíčok

Podložné mikroskopické sklíčka sa pripravujú zo sedimentu a, podľa úvahy osoby vykonávajúcej analýzu, buď z flotátu, alebo zo suroviny. Ak sa počas prípravy vzoriek použilo preosievanie, pripravujú sa dve vzniknuté frakcie (jemná a hrubšia). Skúšobné dávky frakcií nanesené na podložné mikroskopické sklíčka by mali svojim pomerom zodpovedať celej frakcii.

Na účely uskutočnenia úplného skúšobného protokolu stanoveného v bode 2.1.4.2 sa pripraví dostatočný počet podložných sklíčok.

Mikroskopické podložné sklíčka sa zalejú primeraným preparačným činidlom v súlade so štandardnými operačnými postupmi, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo EURL-AP. Podložné sklíčka sa zakryjú kryciami sklíčkami.

##### 2.1.4.2. Protokoly pozorovania na účely zisťovania živočíšnych častí v krmných zmesiach a v krmných surovinách

Pripravené mikroskopické podložné sklíčka sa pozorujú v súlade s protokolmi pozorovania, ktoré sú stanovené v diagrame č. 1, pokiaľ ide o krmné zmesi a krmné suroviny iné ako čistá rybia múčka, alebo v diagrame č. 2, pokiaľ ide o čistú rybiu múčku.

Mikroskopické pozorovania sa uskutočňujú pomocou kombinovaného mikroskopu, pričom sa pozoruje sediment a podľa úvahy osoby vykonávajúcej analýzu buď na flotáte, alebo na surovine. Pre hrubšie frakcie možno okrem kombinovaného mikroskopu použiť aj stereoskopický mikroskop. Celá plocha mikroskopického podložného sklíčka sa preskúma pri rôznom zväčšení.

Minimálny počet podložných sklíčok, ktoré sa majú pozorovať, treba dôsledne dodržať v každom kroku protokolu pozorovania s výnimkou prípadu, keď celý materiál frakcie neumožňuje dosiahnutie stanoveného počtu podložných sklíčok. Pozorovanie sa uskutočňuje na jednotlivé stanovenie s najviac 6 podložnými sklíčkami.

Osoba vykonávajúca pozorovanie môže na účely uľahčenia identifikácie povahy a pôvodu častíc využiť podporné nástroje, ako sú napr. podporné systémy na rozhodovanie, knižnice snímok a referenčné vzorky.

Diagram 1

**Protokol pozorovania na účely zisťovania živočíšnych častíc v kŕmnych zmesiach a v kŕmnych surovinách iných ako rybia múčka**

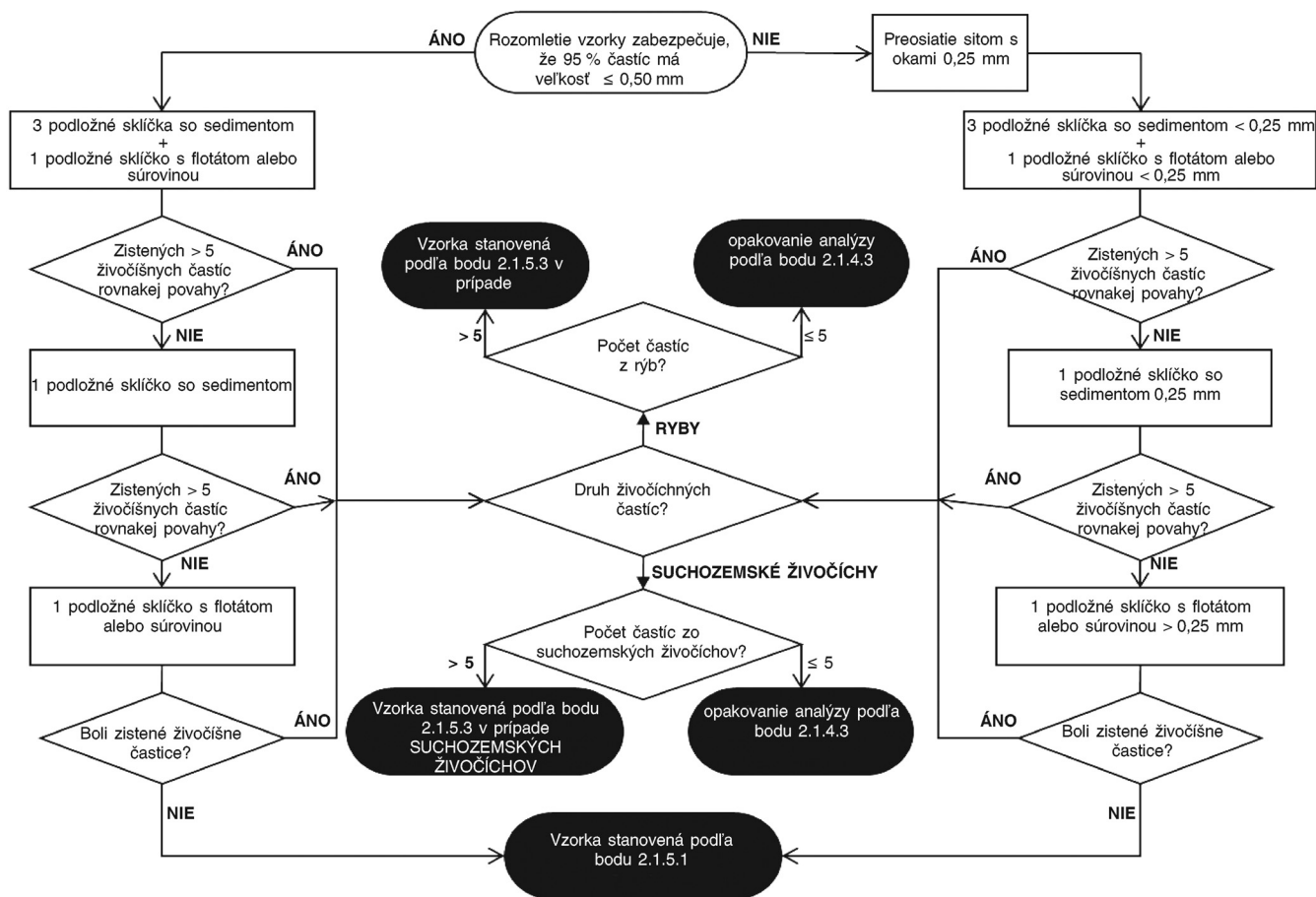
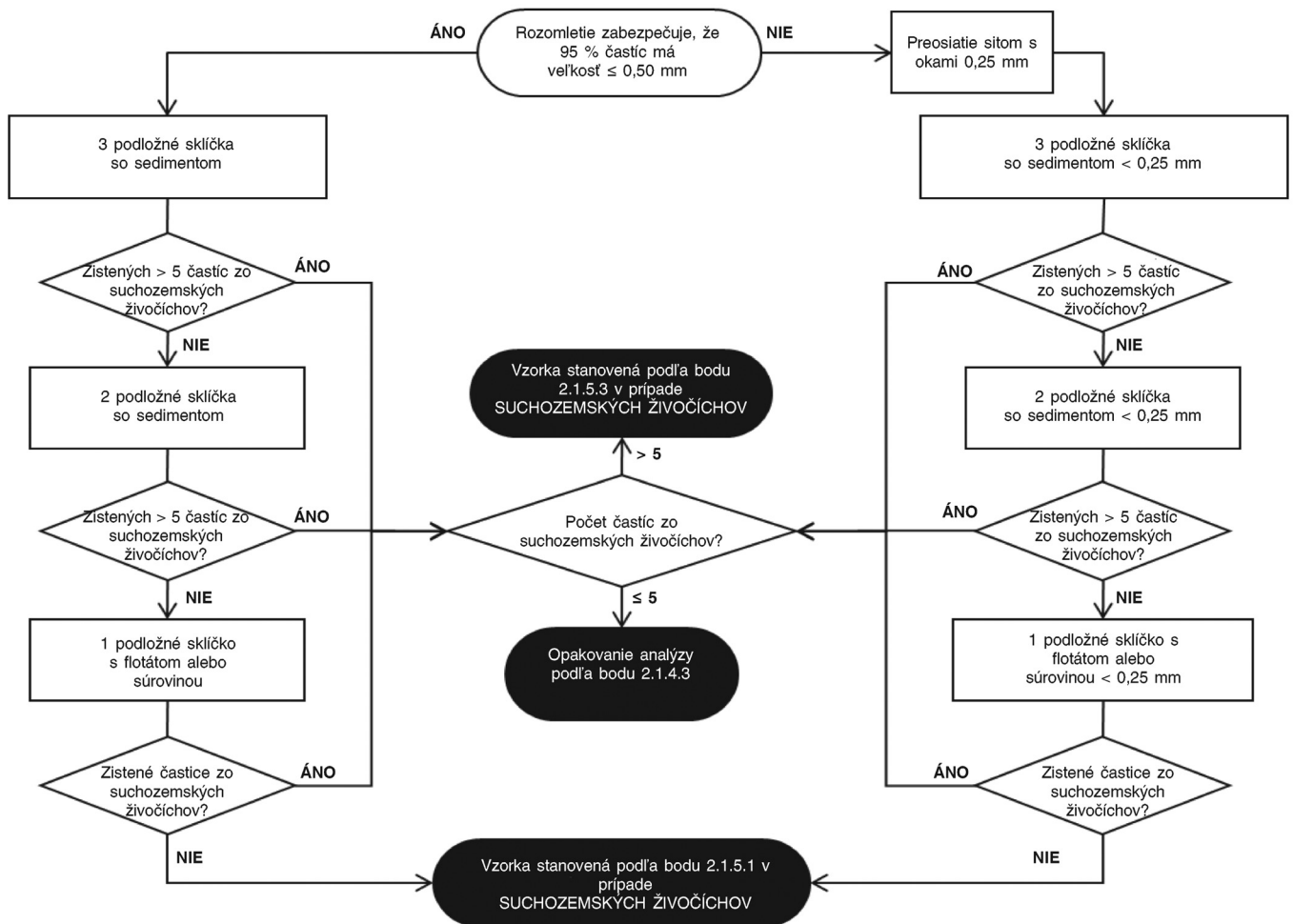


Diagram 2

## Protokol pozorovania na účely zisťovania živočíšnych častíc v rybej múčke





## 2.1.4.3. Počet stanovení

Ak nie je v prvom stanovení, ktoré sa vykonalo v súlade s protokolom pozorovania uvedeným v zodpovedajúcom diagrame 1 alebo 2, zistená žiadna živočíšna častica danej povahy (t. j. zo suchozemského živočícha alebo z ryby), ďalšie stanovenie nie je nutné a výsledky analýzy sa nahlasujú za použitia terminológie stanovenej v bode 2.1.5.1.

Ak sa po prvom stanovení, ktoré sa vykonalo v súlade s protokolmi pozorovania uvedenými v zodpovedajúcom diagrame 1 alebo 2, celkové množstvo zistených živočíšnych častíc danej povahy (t. j. zo suchozemského živočícha alebo z ryby) pohybovalo v rozmedzí 1 až 5, uskutoční sa druhé stanovenie s novou dávkou 50 g podvzorky. Ak sa po tomto druhom stanovení počet zistených živočíšnych častíc danej povahy pohybuje v rozmedzí 0 až 5, podá sa správa o výsledku analýzy s využitím terminológie stanovenej v bode 2.1.5.2., v iných prípadoch sa uskutoční tretie stanovenie s novou dávkou 50 g podvzorky. Ak je však počet častíc danej povahy zistený počas dvoch stanovení vyšší ako 15, ďalšie stanovenie nie je nutné a o výsledku analýzy sa priamo podá správa s využitím terminológie stanovenej v bode 2.1.5.3. Ak je po treťom stanovení celkový počet živočíšnych častíc danej povahy zistený počas troch stanovení vyšší ako 15, podá sa o výsledku analýzy správa s využitím terminológie stanovenej v bode 2.1.5.3. Inak sa o výsledku analýzy podáva správa s využitím terminológie stanovenej v bode 2.1.5.2.

Ak sa po prvom stanovení, ktoré sa vykonalo v súlade s protokolmi pozorovania uvedenými v zodpovedajúcom diagrame 1 alebo 2, zistilo viac ako 5 živočíšnych častíc danej povahy (t. j. zo suchozemského živočícha alebo z ryby), podá sa o výsledku analýzy správa s využitím terminológie stanovenej v bode 2.1.5.3.

## 2.1.5. Vyjadrenie výsledkov

Pri nahlasovaní výsledkov laboratórium uvedie druh materiálu, na ktorom sa analýza uskutočnila (sediment, flotát, surovina), a počet stanovení, ktoré sa vykonali.

Laboratórna správa musí obsahovať aspoň informáciu o prítomnosti zložiek pochádzajúcich zo suchozemských zvierat a z rýb.

Jednotlivé situácie sa oznamujú takto:

## 2.1.5.1. Nebola zistená žiadna častica živočíšneho pôvodu danej povahy:

- v predloženej vzorke nebola nájdená žiadna častica pochádzajúca zo suchozemských zvierat rozoznateľná svetelným mikroskopom,
- v predloženej vzorke nebola nájdená žiadna častica pochádzajúca z rýb rozoznateľná svetelným mikroskopom.

## 2.1.5.2. Bolo zistených v priemere 1 až 5 živočíšnych častíc danej povahy:

- na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke nezistilo v priemere viac ako päť častíc zo suchozemských živočíchov na jednotlivé stanovenia. V prípade zistených častíc išlo o ... (kosť, chrupavku, svalové vlákno, chlpy, rohy ...). Vzhľadom na túto nízku mieru prítomnosti častíc pod hraničnou hodnotou detekcie pri využití mikroskopickej metódy sa nedá vylúčiť riziko falošne pozitívneho výsledku,

alebo prípadne

- na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke nezistilo v priemere viac ako päť častíc z rýb na jednotlivé stanovenia. V prípade zistených častíc išlo o ... [rybie kosti, šupiny, chrupavku, svalové vlákno, otolit, žiabre ...]. Vzhľadom na túto nízku mieru prítomnosti častíc pod hraničnou hodnotou detekcie pri využití mikroskopickej metódy sa nedá vylúčiť riziko falošne pozitívneho výsledku.

Ak sa použilo predbežné preosievanie vzorky, uvádza sa v laboratórnej správe frakcia (preosiata frakcia, granulovaná frakcia alebo jadrové krmivo), v ktorej boli zistené živočíšne častice, keďže zistenie živočíšnych častíc iba v prípade preosievanej frakcie môže byť ukazovateľom kontaminácie z okolitého prostredia.

## 2.1.5.3. Bolo zistených v priemere viac ako 5 živočíšnych častíc danej povahy

- Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke zistilo v priemere viac ako päť častíc zo suchozemských živočíchov na jednotlivé stanovenia. V prípade týchto častíc išlo o ... (kosť, chrupavku, svalové vlákno, chlpy, rohy...).

Alebo prípadne

- na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke zistilo v priemere viac ako päť častíc zo suchozemských živočíchov na jednotlivé stanovenia. V prípade týchto častíc išlo o ... (rybie kosti, šupiny, chrupavku, svalové vlákno, otolit, žiabre...).

Ak sa použilo predbežné preosievanie vzorky, uvádza sa v laboratórnej správe frakcia (preosiata frakcia, granulovaná frakcia alebo jadrové krmivo), v ktorej boli zistené živočíšne častice, keďže zistenie živočíšnych častíc iba v prípade preosievanej frakcie môže byť ukazovateľom kontaminácie z okolitého prostredia.

## 2.2. PCR

### 2.2.1. Princíp

Fragmenty kyseliny deoxyribonukleovej (DNA) živočíšneho pôvodu, ktoré môžu byť prítomné v kŕmnych surovinách a kŕmnych zmesiach, sa zisťujú prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie pomocou genetickej amplifikácie, ktorá sa zameriava na príslušné sekvencie DNA jednotlivých živočíšnych druhov.

Metóda polymerázovej reťazovej reakcie si vyžaduje fázu extrakcie DNA. Fáza amplifikácie sa používa na takto získaný extrakt DNA s cieľom zistiť živočíšne druhy, na ktoré je skúška zameraná.

### 2.2.2. Činidlá a vybavenie

#### 2.2.2.1. Činidlá

##### 2.2.2.1.1. Činidlá pre fázu extrakcie DNA

Používajú sa iba činidlá, ktoré schválilo a na svojich internetových stránkach zverejnilo EURL-AP.

##### 2.2.2.1.2. Činidlá pre fázu genetickej amplifikácie

###### 2.2.2.1.2.1. Primery a sondy

Používajú sa iba primery a sondy so sekvenciami oligonukleotidov, ktoré validovalo Referenčné laboratórium EÚ pre živočíšne proteíny v krmivách <sup>(1)</sup>.

###### 2.2.2.1.2.2. Master Mix

Používajú sa iba roztoky Master Mix, ktoré neobsahujú činidlá, ktoré by mohli viesť k nesprávnym výsledkom z dôvodu prítomnosti živočíšnej DNA <sup>(2)</sup>.

###### 2.2.2.1.2.3. Činidlá pre dekontamináciu

###### 2.2.2.1.2.3.1. Roztok kyseliny chlorovodíkovej (0,1 N)

###### 2.2.2.1.2.3.2. Bieliadlo (roztok hypochloritu sodného s 0,15 % aktívneho chlóru)

###### 2.2.2.1.2.3.3. Činidlá bez žieravých účinkov na dekontamináciu nákladných prístrojov, ako sú napr. analytické váhy (napr. DNA Erase<sup>TM</sup> od spoločnosti MP Biomedicals)

### 2.2.2.2. Vybavenie

#### 2.2.2.2.1. Analytická váha s presnosťou 0,001 g

#### 2.2.2.2.2. Mlecie zariadenie

#### 2.2.2.2.3. Termocykler umožňujúci polymerázovú reťazovú reakciu v reálnom čase

#### 2.2.2.2.4. Mikroodstredivka pre skúmavky do mikroodstredivky

#### 2.2.2.2.5. Sada mikropipiet umožňujúcich pipetovanie od 1 µl do 1 000 µl

#### 2.2.2.2.6. Bežné plastové vybavenie pre molekulárnu biológiu: skúmavky pre mikroodstredivky, plastové špičky mikropipiet s filtrom, misky vhodné pre termocykler.

#### 2.2.2.2.7. Mrziace boxy na uchovávanie vzoriek a činidiel

<sup>(1)</sup> Zoznam týchto primerov a sond je pre jednotlivé druhy živočíchov k dispozícii na internetových stránkach EURL-AP.

<sup>(2)</sup> Príklady Master Mixov, ktoré možno použiť, sú k dispozícii na internetových stránkach EURL-AP.

- 2.2.3. *Odber a príprava vzoriek*
- 2.2.3.1. *Odber vzoriek*  
Používa sa reprezentatívna vzorka odobraná podľa postupov stanovených v prílohe I.
- 2.2.3.2. *Príprava vzorky*  
Príprava laboratórnych vzoriek na extrakciu DNA musí spĺňať požiadavky stanovené v prílohe II. Aspoň 50 g vzorky by sa malo rozdeliť na podvzorky na účely analýzy a následne rozomlieť.  
Príprava vzorky prebieha v inej miestnosti ako je miestnosť určená na extrakciu DNA a na reakcie genetickej amplifikácie, ako je stanovené v norme ISO 24276.  
Pripravujú sa dve testovacie dávky, každá minimálne s hmotnosťou 100 mg.
- 2.2.4. *Extrakcia DNA*  
Extrakcia DNA sa uskutoční v prípade každej testovacej dávky pripravenej podľa štandardných operačných postupov, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo EURL-AP.  
V prípade každej extrakčnej série sa pripravujú dve extrakčné kontrolné vzorky, ako je stanovené v norme ISO 24276.  
— jedna extrakčná slepá kontrolná vzorka,  
— jedna pozitívna kontrolná vzorka extrakcie DNA.
- 2.2.5. *Genetická amplifikácia*  
Genetická amplifikácia sa vykonáva s využitím metód validovaných pre každý druh, ktorý vyžaduje identifikáciu. Tieto metódy sú stanovené v štandardných operačných postupoch, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo EURL-AP. Každý extrakt DNA sa analyzuje aspoň v dvoch rozdielnych riedeniach, aby bolo možné vyhodnotiť inhibíciu.  
Pre každý cieľový druh sa pripravujú dve kontrolné vzorky amplifikácie, ako je stanovené v norme ISO 24276:  
— pozitívna cieľová kontrolná vzorka DNA sa použije pre každú platňu alebo sériu skúšok prostredníctvom PCR,  
— kontrola amplifikácie činidla (nazývaná aj negatívna kontrolná vzorka) sa použije pre každú platňu alebo sériu skúšok prostredníctvom PCR.
- 2.2.6. *Interpretácia a vyjadrenie výsledkov*  
Pri nahlasovaní výsledkov uvádza laboratórium minimálne hmotnosť použitých skúšobných dávok, použitý spôsob extrakcie, počet uskutočnených stanovení a medznú hodnotu detekcie danej metódy.  
Výsledky sa neinterpretujú a neohlasujú, ak pozitívna kontrolná vzorka extrakcie DNA a pozitívne cieľové kontroly DNA nie sú pre skúmaný cieľ pozitívne a zároveň je kontrola amplifikácie činidla negatívna.  
V prípade nezlučiteľných výsledkov z dvoch testovacích dávok sa zopakuje aspoň fáza genetickej amplifikácie. Ak sa laboratórium domnieva, že nezlučiteľnosti by mohli byť zapríčinené extraktmi DNA, pred interpretáciou výsledkov sa uskutoční nová extrakcia DNA a následná genetická amplifikácia.  
Konečné vyjadrenie výsledkov je založené na integrácii a interpretácii výsledkov dvoch skúšobných dávok podľa štandardných operačných postupov, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo EURL-AP.
- 2.2.6.1. *Negatívny výsledok*  
Negatívny výsledok sa oznamuje takto:  
V predloženej vzorke nebola zistená žiadna DNA z X (pričom X označuje živočíšny druh alebo skupinu živočíšnych druhov, na ktorý alebo ktorú bola skúška zameraná).
- 2.2.6.2. *Pozitívny výsledok*  
Pozitívny výsledok sa oznamuje takto:  
V predloženej vzorke bola zistená DNA z X (pričom X označuje živočíšny druh alebo skupinu živočíšnych druhov, na ktorý alebo ktorú bola skúška zameraná).“