

REGOLAMENTO (UE) N. 51/2013 DELLA COMMISSIONE

del 16 gennaio 2013

che modifica il regolamento (CE) n. 152/2009 del Consiglio per quanto riguarda i metodi d'analisi per la determinazione dei costituenti di origine animale nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti per animali

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 11, paragrafo 4,

considerando quanto segue:

- (1) L'articolo 7, paragrafo 1, del regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 maggio 2001, recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili ⁽²⁾ vieta la somministrazione ai ruminanti di proteine animali. Tale divieto è esteso agli animali diversi dai ruminanti ed è limitato, per quanto riguarda l'alimentazione di tali animali con prodotti di origine animale, come specificato nell'allegato IV di detto regolamento.
- (2) L'articolo 11, paragrafo 1, del regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 ⁽³⁾ vieta l'alimentazione di animali terrestri di una determinata specie, esclusi gli animali da pelliccia, con proteine animali trasformate ottenute da corpi o parti di corpi di animali della stessa specie e l'alimentazione di pesci d'allevamento con proteine animali trasformate ottenute da corpi o parti di corpi di pesci d'allevamento della stessa specie.
- (3) Il regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione, del 27 gennaio 2009, che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali stabilisce all'allegato VI i metodi d'analisi per la determinazione dei costituenti di origine animale nell'ambito del

controllo ufficiale degli alimenti per animali ⁽⁴⁾. Il metodo microscopico, che è attualmente il solo metodo convalidato per rilevare la presenza di proteine animali negli alimenti per animali è in grado di distinguere la presenza di costituenti derivati da animali terrestri dalla presenza di costituenti derivati da pesci, ma non è in grado di determinare con sufficiente precisione la quantità di costituenti di origine animale presenti negli alimenti per animali e non può quindi essere utilizzato a tal fine.

- (4) Un nuovo metodo di individuazione dei costituenti di origine animale basato sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) è stato validato dal laboratorio di riferimento dell'UE per le proteine animali negli alimenti per animali. Uno studio organizzato con i laboratori nazionali di riferimento degli Stati membri ha dimostrato che il nuovo metodo è sufficientemente robusto per essere utilizzato come metodo ufficiale di controllo nell'Unione. Questo nuovo metodo è in grado di rilevare la presenza di costituenti di origine animale negli alimenti per animali e di identificare la specie d'origine di tali costituenti. L'uso di questo nuovo metodo in combinazione con il metodo microscopico o in sostituzione di esso, secondo i casi, sarebbe di grande utilità per il controllo della corretta applicazione dei divieti riguardanti l'alimentazione degli animali previsti dai regolamenti (CE) n. 999/2001 e (CE) n. 1069/2009.
- (5) L'allegato VI del regolamento (CE) n. 152/2009 deve quindi essere sostituito di conseguenza.
- (6) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e la salute animale e ad esse non si sono opposti né il Parlamento europeo né il Consiglio,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

L'allegato VI del regolamento (CE) n. 152/2009 è sostituito dal testo che figura nell'allegato del presente regolamento.

⁽¹⁾ GU L 165 del 30.4.2004, pag. 1.

⁽²⁾ GU L 147 del 31.5.2001, pag. 1.

⁽³⁾ GU L 300 del 14.11.2009, pag. 1.

⁽⁴⁾ GU L 54 del 26.2.2009, pag. 1.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 16 gennaio 2013

Per la Commissione
Il presidente
José Manuel BARROSO

ALLEGATO

«ALLEGATO VI

METODI D'ANALISI PER LA DETERMINAZIONE DEI COSTITUENTI DI ORIGINE ANIMALE NELL'AMBITO DEL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI

1. FINALITÀ E CAMPO DI APPLICAZIONE

La determinazione dei costituenti di origine animale negli alimenti per animali è eseguita mediante microscopia ottica o mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) in conformità alle disposizioni del presente allegato.

Questi due metodi permettono di individuare la presenza di costituenti di origine animale nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti, ma non di calcolarne la quantità. Entrambi i metodi presentano un limite di rilevazione inferiore a 0,1 % (p/p).

Il metodo PCR consente di identificare il gruppo tassonomico dei costituenti di origine animale presenti nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti.

Questi metodi si applicano per il controllo dell'applicazione dei divieti di cui all'articolo 7, paragrafo 1, e all'allegato IV del regolamento (CE) n. 999/2001 e all'articolo 11, paragrafo 1, del regolamento (CE) n. 1069/2009.

In funzione del tipo di alimento per animali analizzato, questi metodi possono essere utilizzati, entro un unico protocollo operativo, singolarmente o in combinazione, secondo le procedure operative standard (POS) stabilite dal laboratorio di riferimento dell'UE per le proteine animali negli alimenti per animali (di seguito "EURL-AP") e pubblicate sul suo sito web ⁽¹⁾.

2. METODI

2.1. **Microscopia ottica**2.1.1. *Principio*

I costituenti di origine animale che possono essere presenti nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti sottoposti ad analisi sono individuati sulla base di caratteristiche tipiche e identificabili al microscopio, come fibre muscolari o altre particelle di carne, cartilagini, ossa, corna, peli, setole, sangue, piume, gusci d'uovo, lisce e scaglie.

2.1.2. *Reagenti e attrezzature*

2.1.2.1. Reagenti

2.1.2.1.1. Agente concentratore

2.1.2.1.1.1. Tetracloroetilene (densità 1,62)

2.1.2.1.2. Reagente colorante

2.1.2.1.2.1. Soluzione di rosso di alizarina (diluire 2,5 ml di acido cloridrico 1M in 100 ml di acqua, aggiungere 200 mg di rosso di alizarina alla soluzione)

2.1.2.1.3. Mezzi di montaggio

2.1.2.1.3.1. Liscivia (NaOH a 2,5 % in p/v o KOH a 2,5 % in p/v)

2.1.2.1.3.2. Glicerolo (non diluito, viscosità: 1 490 cP)

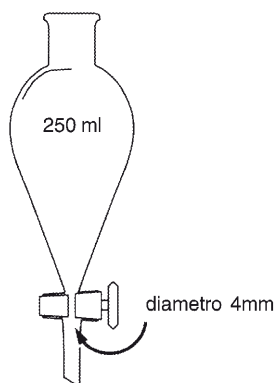
2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (viscosità: 1 200 cP) o resina con proprietà equivalenti per la preparazione dei vetrini permanenti

2.1.2.1.4. Mezzi di montaggio con proprietà coloranti

2.1.2.1.4.1. Soluzione di Lugol (sciogliere 2 g di ioduro di potassio in 100 ml di acqua e aggiungere 1 g di iodio agitando ripetutamente)

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2. Reagente cistina (2 g di acetato di piombo, 10 g di NaOH/100 ml di acqua)
- 2.1.2.1.4.3. Reagente di Fehling [preparato prima dell'uso da parti eguali (1/1) di due soluzioni madre A e B. Soluzione A: sciogliere 6,9 g di solfato di rame (II) pentaidrato in 100 ml di acqua. Soluzione B: sciogliere 34,6 g di tartrato di potassio e di sodio tetraidrato e 12 g di NaOH in 100 ml di acqua]
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidina/perossido di idrogeno [sciogliere 1 g di 3,3', 5,5'tetrametilbenzidina (TMB) in 100 ml di acido acetico glaciale e 150 ml di acqua. Prima dell'uso, mescolare 4 parti di questa soluzione di TMB con 1 parte di perossido di idrogeno al 3 %]
- 2.1.2.1.5. Agenti di risciacquo
- 2.1.2.1.5.1. Etanolo ≥ 96 % (per analisi)
- 2.1.2.1.5.2. Acetone (per analisi)
- 2.1.2.1.6. Reagente sbiancante
- 2.1.2.1.6.1. Soluzione di ipoclorito di sodio in commercio (9-14 % di cloro attivo)
- 2.1.2.2. Attrezzature
- 2.1.2.2.1. Bilancia analitica con precisione di 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Apparecchiatura per macinazione: mulino o mortaio
- 2.1.2.2.3. Setacci a maglie quadrate di 0,25 mm e 1 mm di larghezza
- 2.1.2.2.4. Imbuto separatore conico di vetro con capacità di 250 ml munito di rubinetto in teflon o vetro smerigliato alla base del cono. Il diametro dell'apertura del rubinetto deve essere di almeno 4 mm. In alternativa, può essere utilizzato un decantatore a fondo conico, a condizione che il laboratorio abbia dimostrato che i livelli di rilevamento sono equivalenti a quello ottenuto utilizzando l'imbuto separatore conico di vetro.

Imbuto separatore

- 2.1.2.2.5. Stereomicroscopio con gamma di ingrandimenti finali almeno da $6,5 \times$ a $40 \times$
- 2.1.2.2.6. Microscopio composto in campo chiaro a luce trasmessa con gamma di ingrandimenti finali almeno da $100 \times$ a $400 \times$. Possono inoltre essere utilizzati la luce polarizzata e il contrasto interferenziale differenziale.
- 2.1.2.2.7. Vetreria da laboratorio standard
- 2.1.2.2.8. Attrezzatura per la preparazione dei vetrini: vetrini per microscopio classici, vetrini concavi, vetrini coprioggetti (20×20 mm), pinzette, spatole
- 2.1.3. *Campionamento e preparazione del campione*
- 2.1.3.1. Campionamento
- È utilizzato un campione rappresentativo, prelevato secondo le prescrizioni dell'allegato I.

2.1.3.2. Precauzioni

Per evitare rischi di contaminazione crociata in laboratorio, tutte le attrezzature riutilizzabili devono essere accuratamente pulite prima dell'uso. Prima di essere pulito l'imbuto separatore deve essere smontato. I pezzi che compongono l'imbuto separatore e le vetrerie devono essere prima lavati a mano e poi in lavastoviglie. I setacci devono essere puliti usando una spazzola a setole sintetiche rigide. Dopo la setacciatura di materie grasse, come le farine di pesce, è raccomandata una pulitura finale dei setacci con acetone e aria compressa.

2.1.3.3. Preparazione dei campioni diversi da grassi o oli

2.1.3.3.1. Essiccazione del campione: i campioni con tenore di umidità > 14 % devono essere essiccati prima del trattamento.

2.1.3.3.2. Presetacciatura del campione: si raccomanda di presetacciare a 1 mm i mangimi pellettati e le granaglie e poi di preparare e analizzare le due frazioni risultanti come campioni distinti.

2.1.3.3.3. Sottocampionamento e macinatura: prelevare dal campione e macinare un sottocampione di almeno 50 g da analizzare.

2.1.3.3.4. Estrazione e preparazione del sedimento: trasferire una porzione di 10 g (precisione 0,01 g) del sottocampione macinato nell'imbuto separatore o nel decantatore a fondo conico e aggiungere 50 ml di tetracloroetilene. L'aliquota trasferita nell'imbuto è limitata a 3 g nel caso delle farine di pesce o di altri prodotti di origine esclusivamente animale, di ingredienti minerali o di premiscele che generano più del 10 % di sedimento. Agitare vigorosamente la miscela per almeno 30 secondi e versare con cautela almeno altri 50 ml di tetracloroetilene sulla superficie interna dell'imbuto per rimuovere le particelle aderenti ad esso. Lasciare riposare la miscela così ottenuta per almeno 5 minuti prima di separare il sedimento aprendo il rubinetto.

Se è utilizzato un decantatore a fondo conico, agitare vigorosamente la miscela per almeno 15 secondi e lavare accuratamente la superficie interna del decantatore con almeno 10 ml di tetracloroetilene pulito per rimuovere le particelle aderenti alle pareti. Lasciare riposare la miscela per 3 minuti, quindi agitare nuovamente per 15 secondi e lavare accuratamente la superficie interna del decantatore con almeno 10 ml di tetracloroetilene pulito per rimuovere le particelle aderenti alle pareti. Lasciare riposare la miscela così ottenuta per almeno 5 minuti, quindi rimuovere ed eliminare la frazione liquida travasandola accuratamente, facendo attenzione a non perdere nulla del sedimento.

Lasciar seccare il sedimento e poi procedere alla sua pesatura (precisione 0,001 g). Se il sedimento è costituito per più del 5 % da particelle > 0,50 mm, setacciare a 0,25 mm e procedere all'esame delle due frazioni risultanti.

2.1.3.3.5. Estrazione e preparazione del flottato: dopo il recupero del sedimento con il metodo sopra descritto, devono rimanere nell'imbuto separatore due fasi: una fase liquida costituita dal tetracloroetilene e una fase solida costituita dal materiale flottante. Recuperare la fase solida (flottato) facendo defluire completamente dall'imbuto il tetracloroetilene aprendo il rubinetto. Rovesciando l'imbuto separatore, trasferire il flottato in una grande piastra Petri e farlo essiccare ad aria in una cappa aspirante. Se il flottato è costituito per più del 5 % da particelle > 0,50 mm, setacciare a 0,25 mm e procedere all'esame delle due frazioni risultanti.

2.1.3.3.6. Preparazione del campione tal quale: preparare un'aliquota di almeno 5 g di sottocampione macinato. Se questo materiale è costituito per più del 5 % da particelle > 0,50 mm, setacciare a 0,25 mm e procedere all'esame delle due frazioni risultanti.

2.1.3.4. Preparazione di campioni costituiti da grassi o oli

Per la preparazione di campioni costituiti da grassi o oli, seguire il seguente protocollo:

- se il grasso si presenta in forma solida, scaldarlo in un forno fino a liquefarlo,
- utilizzando una pipetta trasferire con una 40 ml di grasso o olio dal fondo del campione in un tubo di centrifugazione,
- centrifugare per 10 minuti a 4 000 giri/minuto,
- se il grasso si presenta in forma solida dopo la centrifugazione, riscaldarlo in un forno fino a liquefarlo,
- ripetere la centrifugazione per 5 minuti a 4 000 giri/minuto,

- trasferire con un cucchiaino o una spatola metà delle impurità decantate su vetrini per microscopico per l'esame; si raccomanda il glicerolo come mezzo di montaggio,
- utilizzare le impurità restanti per preparare il sedimento come indicato al punto 2.1.3.3.

2.1.3.5. Uso di reagenti coloranti

Per facilitare la corretta identificazione dei costituenti di origine animale, l'operatore può utilizzare reagenti di colorazione durante la preparazione dei campioni, seguendo le linee guida emesse dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web.

Il sedimento può essere sottoposto a colorazione utilizzando una soluzione di rosso di alizarina, applicando il seguente protocollo:

- trasferire il sedimento secco in una provetta di vetro e risciacquare due volte con circa 5 ml di etanolo (utilizzare ogni volta un agitatore vortex per 30 secondi, lasciare decantare il solvente per circa 1 min 30 s ed eliminarlo),
- sbiancare il sedimento aggiungendo almeno 1 ml di soluzione di ipoclorito di sodio. Lasciare reagire per 10 minuti. Riempire d'acqua la provetta, lasciare decantare il sedimento per 2-3 minuti ed eliminare con cautela l'acqua e le particelle in sospensione,
- risciacquare altre due volte il sedimento con circa 10 ml di acqua (utilizzare un agitatore vortex per 30 secondi, lasciare decantare ed eliminare l'acqua ogni volta),
- aggiungere da 2 a 10 gocce di soluzione di rosso di alizarina e agitare su vortex la miscela. Lasciare reagire per 30 secondi e risciacquare due volte il sedimento colorato con circa 5 ml di etanolo e poi una volta con acetone (utilizzare ogni volta un agitatore vortex per 30 secondi, lasciare decantare il solvente per circa un minuto ed eliminarlo),
- essiccare il sedimento colorato.

2.1.4. *Esame microscopico*

2.1.4.1. Preparazione dei vetrini

Preparare i vetrini per microscopio a partire dal sedimento e, a scelta dell'operatore, dal flottato o dalla frazione di campione tal quale. Se nel corso della preparazione del campione è stata effettuata una setacciatura, preparare le due frazioni risultanti (fine e grossolana). Le porzioni di materiale da analizzare distribuite sui vetrini devono essere rappresentative dell'intera frazione.

Preparare un numero di vetrini sufficiente perché possa essere realizzato un protocollo d'esame completo, come previsto al punto 2.1.4.2.

Montare i vetrini per microscopio con il mezzo di montaggio adeguato secondo le procedure operative standard (POS) stabilite dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web. Dopo la distribuzione della frazione in esame, sul vetrino portaoggetti deve essere posizionato il vetrino coprioggetti.

2.1.4.2. Protocolli di osservazione per l'individuazione di particelle animali in mangimi composti e materie prime per mangimi

I vetrini per microscopio preparati sono osservati seguendo i protocolli di osservazione indicati nel diagramma 1 (mangimi composti e materie prime per mangimi diverse dalle farine di pesce) e nel diagramma 2 (farine di pesce pure).

Le osservazioni microscopiche sono effettuate utilizzando il microscopio composto sul sedimento e, a scelta dell'operatore, sul flottato o sulla frazione di campione tal quale. Lo stereomicroscopio può essere utilizzato in aggiunta al microscopio composto per l'osservazione delle frazioni grossolane. Ogni vetrino è esaminato interamente a vari ingrandimenti.

Il numero minimo di vetrini da osservare in ogni fase del protocollo di osservazione deve essere rigorosamente rispettato, a meno che sia impossibile, pur utilizzando tutto il materiale della frazione, raggiungere il numero di vetrini stabilito. Per ogni determinazione sono osservati non più di sei vetrini.

Per facilitare l'identificazione della natura e dell'origine delle particelle, l'operatore può utilizzare ausili quali sistemi di aiuto alle decisioni, gallerie di immagini e campioni di riferimento.

Diagramma 1

Protocollo di osservazione per l'individuazione di particelle animali nei mangimi composti e nelle materie prime per mangimi diverse dalle farine di pesce

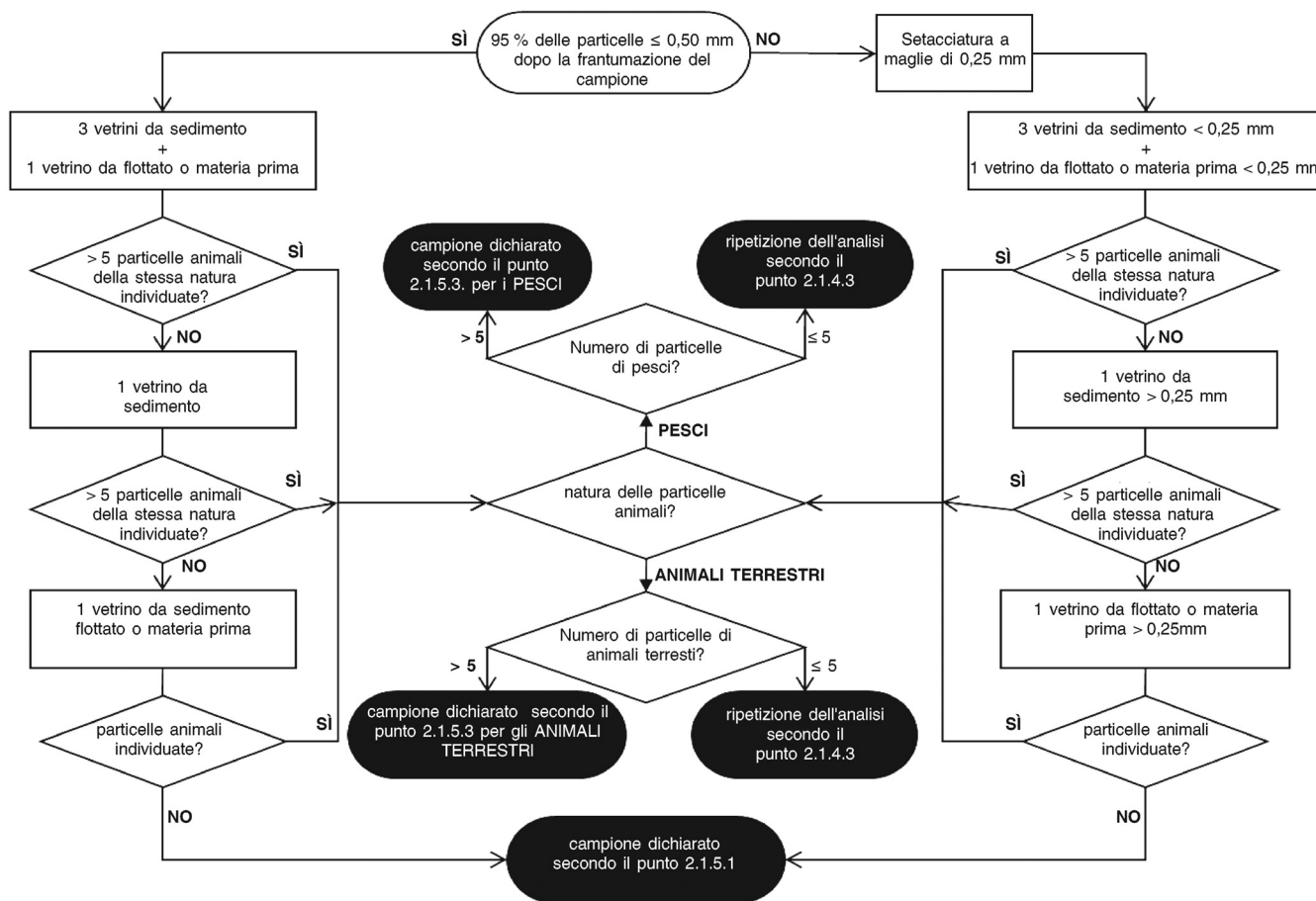
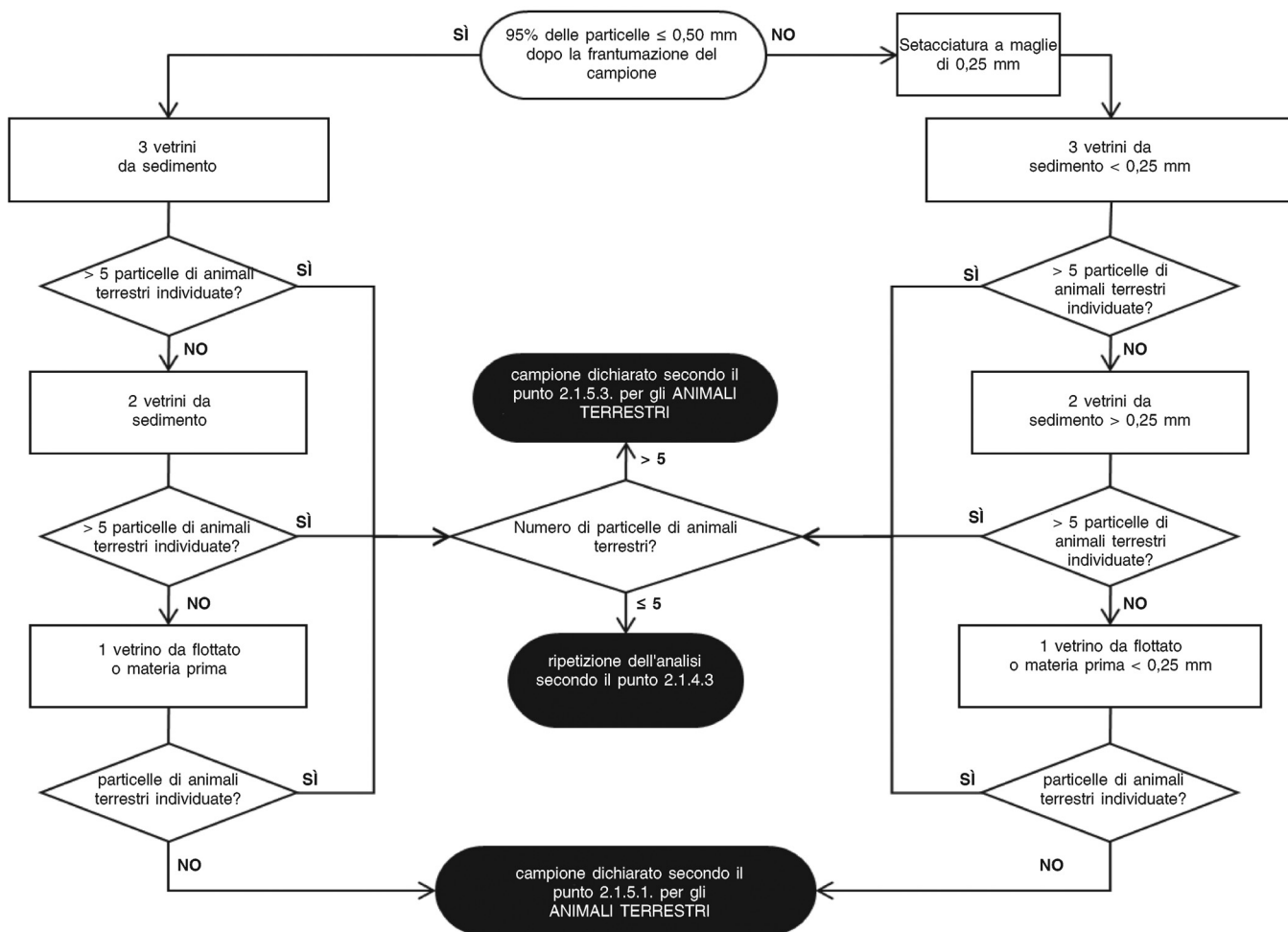


Diagramma 2

Protocollo di osservazione per l'individuazione di particelle animali nelle farine di pesce



2.1.4.3. Numero di determinazioni

Se a seguito di una prima determinazione effettuata secondo il protocollo di osservazione figurante nel diagramma 1 o nel diagramma 2, secondo il caso, non sono individuate particelle animali di una data natura (animale terrestre o pesce), non è necessaria una determinazione aggiuntiva e il risultato dell'analisi è espresso utilizzando la frase indicata al punto 2.1.5.1.

Se, a seguito di una prima determinazione effettuata secondo i protocolli di osservazione figuranti, secondo il caso, nel diagramma 1 o nel diagramma 2, il numero totale delle particelle animale di una data natura (animale terrestre o pesce) individuate è compreso tra 1 e 5, è effettuata una seconda determinazione a partire da un nuovo sottocampione di 50 g. Se, a seguito di questa seconda determinazione, il numero delle particelle animali della data natura individuate è compreso tra 0 e 5, il risultato dell'analisi è espresso utilizzando la frase indicata al punto 2.1.5.2, in caso contrario, è effettuata una terza determinazione a partire da un nuovo sottocampione di 50 g. Tuttavia, se dopo la prima e la seconda determinazione la somma delle particelle animali di una data natura individuate nelle due determinazioni è superiore a 15, la determinazione aggiuntiva non è necessaria e il risultato dell'analisi è espresso direttamente utilizzando la frase indicata al punto 2.1.5.3. Se dopo la terza determinazione la somma delle particelle animali di una data natura individuate nelle tre determinazioni è superiore a 15, il risultato dell'analisi è espresso utilizzando la frase indicata al punto 2.1.5.3; in caso contrario, il risultato dell'analisi è espresso utilizzando la frase indicata al punto 2.1.5.2.

Se, a seguito di una prima determinazione effettuata secondo i protocolli di osservazione figuranti, secondo il caso, nel diagramma 1 o nel diagramma 2, sono individuate più di 5 particelle animali di una data natura (animale terrestre o pesce), il risultato dell'analisi è espresso utilizzando la frase indicata al punto 2.1.5.3.

2.1.5. *Espressione dei risultati*

Quando comunica i risultati, il laboratorio indica il tipo di materiale su cui è stata effettuata l'analisi (sedimento, flottato o frazione di campione tal quale) e il numero di determinazioni effettuate.

Il rapporto del laboratorio contiene almeno informazioni sulla presenza di costituenti derivati da animali terrestri e da pesci.

Le diverse situazioni sono riportate nei modi sottoindicati.

2.1.5.1. Se non sono state individuate particelle animali di una data natura:

— nel campione esaminato al microscopio ottico non sono state individuate particelle derivate da animali terrestri,

— nel campione esaminato al microscopio ottico non sono state individuate particelle derivate da pesci.

2.1.5.2. Se sono state individuate una media tra 1 e 5 particelle animali di una data natura:

— nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate in media per determinazione non più di 5 particelle derivate da animali terrestri. Le particelle sono state identificate come ... [ossa, cartilagine, fibre muscolari, peli, corna ...]. Dato il basso numero di particelle, inferiore al limite di rilevazione del metodo microscopico, non può essere escluso il rischio di un falso risultato positivo.

Oppure, secondo il caso:

— nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate in media per determinazione non più di 5 particelle derivate da pesci. Le particelle sono state identificate come ... [liscia, scaglia, cartilagine, muscolo, otolite, branchia ...]. Dato il basso numero di particelle, inferiore al limite di rilevazione del metodo microscopico, non può essere escluso il rischio di un falso risultato positivo.

Se il campione è stato sottoposto a presetacciamento, il rapporto del laboratorio indica in quale frazione (frazione setacciata, frazione pellettata o granuli) sono state individuate le particelle animali, in quanto l'individuazione di particelle animali soltanto nella frazione setacciata può essere il segno di una contaminazione ambientale.

2.1.5.3. Se sono state individuate una media di più di 5 particelle animali di una data natura:

— nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate in media per determinazione più di 5 particelle derivate da animali terrestri. Le particelle sono state identificate come ... [ossa, cartilagine, fibre muscolari, peli, corna ...].

Oppure, secondo il caso:

- nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate in media per determinazione più di 5 particelle derivate da pesci. Le particelle sono state identificate come ... [liscia, scaglia, cartilagine, muscolo, otolite, branchia ...].

Se il campione è stato sottoposto a presetacciamento, il rapporto del laboratorio indica in quale frazione (frazione setacciata, frazione pellettata o granuli) sono state individuate le particelle animali, in quanto l'individuazione di particelle animali soltanto nella frazione setacciata può essere il segno di una contaminazione ambientale.

2.2. **Reazione a catena della polimerasi (PCR)**

2.2.1. *Principio*

I frammenti di acido desossiribonucleico (DNA) di origine animale che possono essere presenti nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti sono individuati con una tecnica di amplificazione genica mediante la PCR, mirata a sequenze di DNA specifiche delle specie.

Il metodo PCR richiede dapprima una fase di estrazione del DNA. All'estratto di DNA così ottenuto è quindi applicata la fase di amplificazione per individuare la specie animale bersaglio.

2.2.2. *Reagenti e attrezzature*

2.2.2.1. Reagenti

2.2.2.1.1. Reagenti per l'estrazione del DNA

Utilizzare solo i reagenti approvati dall'EURL-AP e pubblicati sul suo sito web.

2.2.2.1.2. Reagenti per l'amplificazione genica

2.2.2.1.2.1. Primer e sonde

Utilizzare solo primer e sonde con sequenze oligonucleotidiche validate dall'EURL-AP ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Master Mix

Utilizzare solo soluzioni Master Mix che non contengono reagenti che possono portare a risultati falsi a causa della presenza di DNA animale ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Reagenti di decontaminazione

2.2.2.1.2.3.1. Soluzione di acido cloridrico (0,1N)

2.2.2.1.2.3.2. Candeggina (soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,15 % di cloro attivo)

2.2.2.1.2.3.3. Reagenti non corrosivi per la decontaminazione di dispositivi costosi come le bilance analitiche (ad esempio DNA EraseTM di MP Biomedicals)

2.2.2.2. Attrezzature

2.2.2.2.1. Bilancia analitica con precisione di 0,001 g

2.2.2.2.2. Apparecchiatura di macinazione

2.2.2.2.3. Termociclatore per PCR real-time

2.2.2.2.4. Microcentrifuga per microprovette

2.2.2.2.5. Set di micropipette per prelievi da 1 µl a 1 000 µl

2.2.2.2.6. Plastiche standard per biologia molecolare: microprovette per microcentrifuga, puntali con filtro per micropipette, piastre adatte al termociclatore

2.2.2.2.7. Congelatori per la conservazione dei campioni e dei reagenti

⁽¹⁾ L'elenco dei primer e delle sonde per ciascuna specie animale bersaglio è disponibile sul sito web dell'EURL-AP.

⁽²⁾ Esempi di Master Mix funzionali sono disponibili sul sito web dell'EURL-AP.

- 2.2.3. *Campionamento e preparazione del campione*
- 2.2.3.1. *Campionamento*
- Deve essere utilizzato un campione rappresentativo, prelevato secondo le prescrizioni dell'allegato I.
- 2.2.3.2. *Preparazione del campione*
- La preparazione dei campioni di laboratorio fino all'estrazione del DNA deve avvenire secondo le prescrizioni dell'allegato II. Dal campione è prelevato e successivamente macinato un sottocampione di almeno 50 g da analizzare.
- La preparazione del campione deve essere effettuata in un locale diverso da quelli utilizzati per l'estrazione del DNA e per le reazioni di amplificazione genica, come descritto dalla norma ISO 24276.
- Preparare due aliquote del campione in analisi, ciascuna di peso non inferiore a 100 mg.
- 2.2.4. *Estrazione del DNA*
- L'estrazione del DNA è effettuata su ogni aliquota da saggio preparata utilizzando le POS stabilite dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web.
- Per ciascuna serie di estrazioni sono preparati due controlli di estrazione, come descritto dalla norma ISO 24276:
- un controllo di estrazione in bianco,
 - un controllo di estrazione del DNA positivo.
- 2.2.5. *Amplificazione genica*
- L'amplificazione genica è effettuata utilizzando i metodi convalidati per ciascuna specie da identificare, indicati nelle POS stabilite dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web. Ogni estratto di DNA è analizzato almeno a due diverse diluizioni per valutare l'inibizione.
- Per ogni specie bersaglio sono preparati due controlli di amplificazione, come descritto dalla norma ISO 24276:
- per ciascuna piastra o serie di saggi PCR è utilizzato un controllo positivo del DNA bersaglio,
 - per ciascuna piastra o serie di saggi PCR è utilizzato un controllo di amplificazione dei soli reagenti (controllo "no template").
- 2.2.6. *Interpretazione ed espressione dei risultati*
- Quando comunica i risultati, il laboratorio indica almeno il peso delle aliquote sottoposte ad analisi, la tecnica di estrazione utilizzata, il numero delle determinazioni eseguite e il limite di rilevazione del metodo.
- I risultati non devono essere interpretati e comunicati se il controllo positivo dell'estrazione del DNA e i controlli positivi del DNA bersaglio non forniscono risultati positivi per il bersaglio analizzato, mentre il controllo di amplificazione dei soli reagenti è negativo.
- Se i risultati delle due aliquote del campione analizzato non sono coerenti, è ripetuto almeno lo step dell'amplificazione genica. Se il laboratorio sospetta che gli estratti di DNA possano essere la causa dell'incoerenza, sono effettuate una nuova estrazione del DNA e una successiva amplificazione genica prima di interpretare i risultati.
- L'espressione finale dei risultati si basa sull'integrazione e sull'interpretazione dei risultati delle due aliquote analizzate secondo le POS stabilite dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web.
- 2.2.6.1. *Risultato negativo*
- Un risultato negativo è espresso come segue:
- Nel campione esaminato non è stato individuato DNA di X (X è la specie animale o il gruppo di specie animali bersaglio).
- 2.2.6.2. *Risultato positivo*
- Un risultato positivo è espresso come segue:
- Nel campione esaminato è stato individuato DNA di X (X è la specie animale o il gruppo di specie animali bersaglio).»
-