

**ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) 2022/893****z dnia 7 czerwca 2022 r.****zmieniające załącznik VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 w odniesieniu do metod analizy dotyczących wykrywania składników pochodzących z bezkręgowców lądowych do celów urzędowej kontroli pasz****(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. w sprawie kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przeprowadzanych w celu zapewnienia stosowania prawa żywnościowego i paszowego oraz zasad dotyczących zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i środków ochrony roślin, zmieniające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001, (WE) nr 396/2005, (WE) nr 1069/2009, (WE) nr 1107/2009, (UE) nr 1151/2012, (UE) nr 652/2014, (UE) 2016/429 i (UE) 2016/2031, rozporządzenia Rady (WE) nr 1/2005 i (WE) nr 1099/2009 oraz dyrektywy Rady 98/58/WE, 1999/74/WE, 2007/43/WE, 2008/119/WE i 2008/120/WE, oraz uchylające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 854/2004 i (WE) nr 882/2004, dyrektywy Rady 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EWG, 96/23/WE, 96/93/WE i 97/78/WE oraz decyzję Rady 92/438/EWG (rozporządzenie w sprawie kontroli urzędowych) <sup>(1)</sup>, w szczególności jego art. 34 ust. 6 akapit pierwszy lit. a),

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu Komisji (WE) nr 152/2009 <sup>(2)</sup> ustanowiono metody badawcze stosowane do wspierania kontroli urzędowych w celu egzekwowania zakazu stosowania przetworzonego białka zwierzęcego w paszy dla zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność. Do metod tych należą metody analizy dotyczące oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz, które opisano w załączniku VI do tego rozporządzenia i które przeprowadza się przy pomocy mikroskopii świetlnej lub łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).
- (2) Rozporządzeniem Komisji (UE) 2017/893 <sup>(3)</sup> udzielono zezwolenia na stosowanie przetworzonego białka zwierzęcego pochodzącego z owadów gospodarskich w paszy dla zwierząt akwakultury, a rozporządzeniem Komisji (UE) 2021/1372 <sup>(4)</sup> w paszy dla świń i drobiu; jego stosowanie jest jednak nadal zakazane na mocy rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 <sup>(5)</sup> w niektórych paszach, w szczególności w paszy dla przeżuwaczy.
- (3) Laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. białek zwierzęcych w paszach opracowało i zatwierdziło specjalny protokół, obejmujący etap podwójnej sedymentacji, która zapewnia wykrywanie cząstek z bezkręgowców lądowych, w tym owadów, jeżeli występują w materiałach paszowych, mieszkankach paszowych i premiksach poddanych badaniom laboratoryjnym. Protokół zawierający ten dodatkowy etap powinien być stosowany w ramach kontroli urzędowych w celu weryfikacji prawidłowego egzekwowania zakazu stosowania przetworzonego białka zwierzęcego pochodzącego z owadów w niektórych paszach dla zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność.

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 95 z 7.4.2017, s. 1.

<sup>(2)</sup> Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz (Dz.U. L 54 z 26.2.2009, s. 1).

<sup>(3)</sup> Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/893 z dnia 24 maja 2017 r. zmieniające załączniki I i IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 oraz załączniki X, XIV i XV do rozporządzenia Komisji (UE) nr 142/2011 w odniesieniu do przepisów dotyczących przetworzonego białka zwierzęcego (Dz.U. L 138 z 25.5.2017, s. 92).

<sup>(4)</sup> Rozporządzenie Komisji (UE) 2021/1372 z dnia 17 sierpnia 2021 r. zmieniające załącznik IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 w odniesieniu do zakazu karmienia zwierząt gospodarskich innych niż przeżuwacze, innych niż zwierzęta futerkowe, białkiem pochodzącym od zwierząt (Dz.U. L 295 z 18.8.2021, s. 1).

<sup>(5)</sup> Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r. ustanawiające zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych pasażalnych gąbczastych encefalopatii (Dz.U. L 147 z 31.5.2001, s. 1).

- (4) Należy zatem dostosować opis metody mikroskopii świetlnej określony w załączniku VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 w celu uwzględnienia etapu podwójnej sedymentacji w protokole dotyczącym przygotowania próbek do badania pod kątem wykrywania składników pochodzących z bezkręgowców lądowych.
- (5) Należy zatem odpowiednio zmienić załącznik VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009.
- (6) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Roślin, Zwierząt, Żywności i Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

#### Artykuł 1

W załączniku VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

#### Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 7 czerwca 2022 r.

W imieniu Komisji  
Przewodnicząca  
Ursula VON DER LEYEN

## ZAŁĄCZNIK

W załączniku VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 wprowadza się następujące zmiany:

1) pkt 1 otrzymuje brzmienie:

„1. CEL I ZAKRES

Składniki pochodzenia zwierzęcego w paszach oznacza się metodą mikroskopii świetlnej lub łańcuchową reakcją polimerazy (PCR), zgodnie z przepisami określonymi w niniejszym załączniku.

Te dwie metody umożliwiają wykrycie występowania składników pochodzenia zwierzęcego w premiksach, materiałach paszowych i mieszankach paszowych. Nie umożliwiają one jednak obliczenia ilości takich składników w premiksach, materiałach paszowych i mieszankach paszowych. W przypadku obu metod granica wykrywalności wynosi poniżej 0,1 % (w/w).

Metoda PCR umożliwia określenie grupy taksonomicznej składników pochodzenia zwierzęcego obecnych w premiksach, materiałach paszowych i mieszankach paszowych.

Metody te stosuje się do kontroli stosowania zakazów ustanowionych w art. 7 ust. 1 rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 (\*), w załączniku IV do tego rozporządzenia oraz w art. 11 ust. 1 rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 (\*\*).

W zależności od rodzaju badanej paszy metody te mogą być stosowane, w ramach jednego protokołu operacyjnego, samodzielnie albo wspólnie, zgodnie ze standardowymi procedurami operacyjnymi, ustanowionymi przez laboratorium referencyjne UE ds. białek zwierzęcych w paszach (EURL-AP) i opublikowanymi na jego stronie internetowej (\*\*\*).

(\*) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r. ustanawiające zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych pasażowalnych gąbczastych encefalopatii (Dz.U. L 147 z 31.5.2001, s. 1).

(\*\*) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego i produktów pochodnych, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego) (Dz.U. L 300 z 14.11.2009, s. 1).

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

2) pkt 2.1 otrzymuje brzmienie:

„2.1. **Metoda mikroskopii świetlnej**

2.1.1. *Zasada*

Składniki pochodzenia zwierzęcego, które mogą być obecne w premiksach, materiałach paszowych i mieszankach paszowych przesłanych do analizy, są identyfikowane na podstawie typowych i mikroskopowo identyfikowalnych cech charakterystycznych, np. włókien mięśniowych i innych cząstek tkanki mięsnej, chrząstki, kości, rogów, włosów, szczeciny, fragmentów kutykuli bezkręgowców, elementów układu tchawkowego insektów, produktów z krwi, globulek mleka, kryształów laktozy, piór, skorup jaj, ości ryb i łusek.

Badania mikroskopowe przeprowadza się po przygotowaniu próbek poprzez sedymentację.

Próbki poddaje się sedymentacji w następujący sposób:

- a) w celu wykrycia składników pochodzenia zwierzęcego innych niż pochodzących z bezkręgowców lądowych – pojedyncza sedymentacja przy użyciu tetrachloroetyleny, jak określono w pkt 2.1.3.4.3;
- b) w celu wykrycia składników pochodzących z bezkręgowców lądowych – podwójna sedymentacja przy użyciu eteru naftowego/tetrachloroetyleny, jak określono w pkt 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Odczynniki i sprzęt*

2.1.2.1. *Odczynniki*

2.1.2.1.1. *Odczynnik zagęszczający*

- Tetrachloroetylen (gęstość 1,62).
- Eter naftowy, temperatura wrzenia: 40–60 °C (masa właściwa 0,65).

## 2.1.2.1.2. Odczynnik barwiący

- Roztwór czerwieni alizarynowej (rozcieńczyć 2,5 ml 1 M kwasu chlorowodorowego w 100 ml wody i dodać do tego roztworu 200 mg czerwieni alizarynowej).

## 2.1.2.1.3. Środki zamykające

- Ług (NaOH 2,5 %, w/v lub KOH 2,5 %, w/v)
- Glicerol (nierozcieńczony, lepkość: 1 490 cP) lub środek zamykający o równoważnych właściwościach do przygotowania nietrwałych preparatów mikroskopowych.
- Norland® Optical Adhesive 65 (lepkość: 1 200 cP) lub żywica o równoważnych właściwościach do przygotowania trwałych preparatów mikroskopowych.

## 2.1.2.1.4. Środki zamykające o właściwościach barwiących

- Płyn Lugola (rozpuścić 2 g jodku potasu w 100 ml wody i dodać 1 g jodu, często wstrząsając).
- Odczynnik cystynowy (2 g octanu ołowiu, 10 g NaOH/100 ml wody).
- Odczynnik Fehlinga (sporządzony przed użyciem z równych części (1/1) roztworów podstawowych A i B: roztwór A: rozpuścić 6,9 g pentahydratu siarczanu miedzi(II) w 100 ml wody; roztwór B: rozpuścić 34,6 g tetrahydratu winianu potasowo-sodowego i 12 g NaOH w 100 ml wody).
- Tetrametylobenzzydina/nadtlenek wodoru (rozpuścić 1 g 3,3',5,5' tetrametylobenzzydiny (TMB) w 100 ml kwasu octowego lodowatego i 150 ml wody. Przed użyciem mieszać 4 części tego roztworu TMB z 1 częścią 3 % nadtlenku wodoru).

## 2.1.2.1.5. Odczynniki chemiczne do płukania

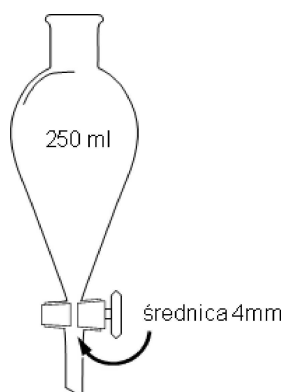
- Etanol  $\geq 96$  % (techniczny).
- Aceton (techniczny).

## 2.1.2.1.6. Odczynnik bielący

- Handlowy roztwór podchlorynu sodowego (9–14 % aktywnego chloru).

## 2.1.2.2. Sprzęt

- Waga analityczna ważąca z dokładnością do 0,001 g.
- Sprzęt do rozdrabniania: nóż lub młynek wirnikowy. Jeżeli stosowany jest młynek wirnikowy, sita do młynka  $\leq 0,5$  mm są zakazane.
- Sita o kwadratowych oczkach o szerokości 0,25 mm i 1 mm. Z wyjątkiem wstępnego przesiewu próbki średnica sit nie powinna przekraczać 10 cm, aby uniknąć strat materiałów. Kalibracja sit nie jest wymagana.
- Szklany stożkowy rozdzielacz o pojemności 250 ml z kranem z teflonu lub szkła szlifowanego u podstawy stożka. Średnica otworu kranu musi wynosić  $\geq 4$  mm. Alternatywnie, wyłącznie w przypadku pojedynczej sedymentacji przy użyciu tetrachloroetyleny, można użyć zlewki osadowej ze stożkowym dnem, pod warunkiem że laboratorium wykazało, iż poziomy wykrywalności są równoważne z poziomami uzyskanymi przy użyciu szklanego rozdzielacza.



Rozdzielacz

- Mikroskop stereoskopowy umożliwiający powiększenie końcowe w zakresie co najmniej 6,5x–40x.
- Mikroskop złożony, z jasnym polem widzenia, umożliwiający powiększenie końcowe w zakresie co najmniej 100x–400x. Dodatkowo można wykorzystać światło spolaryzowane i kontrast interferencyjno-różniczkowy.
- Standardowe szkło laboratoryjne.
- Sprzęt do przygotowania preparatów mikroskopowych: podstawowe szkiełka mikroskopowe, szkiełka podstawowe z wgłębieniem, szkiełka nakrywkowe (20x20 mm), pincety, cienka łopatką.
- Suszarka laboratoryjna.
- Wirówka.
- Bibuła filtracyjna: filtr celulozowy jakościowy (rozmiar porów 4–11 µm).

### 2.1.3. Pobieranie i przygotowywanie próbek

#### 2.1.3.1. Pobieranie próbek

Należy użyć reprezentatywnej próbki, pobranej zgodnie z załącznikiem I.

#### 2.1.3.1.1. Suszenie próbek

Próbki o wilgotności > 14 % muszą być przed obróbką wysuszone zgodnie z załącznikiem III.

#### 2.1.3.1.2. Wstępny przesiew próbek

w celu zebrania informacji na temat możliwego zanieczyszczenia środowiskowego pasz zaleca się wstępne przesianie pasz granulowanych i ziarnistych przez sito o oczkach 1 mm, a następnie przygotowanie i analizę dwóch uzyskanych frakcji, które należy traktować jako odrębne próbki, i przedstawienie wyników dotyczących tych dwóch frakcji.

#### 2.1.3.2. Niezbędne środki ostrożności

W celu uniknięcia w laboratorium zanieczyszczenia krzyżowego wszelki sprzęt wielokrotnego użytku należy starannie czyścić przed użyciem. Części rozdzielacza muszą być demontowane przed czyszczeniem. Części rozdzielacza oraz szkło laboratoryjne należy wstępnie wmyć ręcznie, a następnie wmyć w zmywarce. Sita czyści się z użyciem szczotki o twardym syntetycznym włosiu. Po przesianiu substancji tłuszczowej, np. mączki rybnej, zaleca się ostateczne czyszczenie sit acetonem i sprężonym powietrzem.

#### 2.1.3.3. Przygotowanie próbek składających się z tłuszczu lub oleju

Do przygotowania próbek składających się z tłuszczu stosuje się następujący protokół:

- jeżeli tłuszcz znajduje się w stanie stałym, należy go ogrzewać w suszarce aż do uzyskania postaci płynnej.
- Pipetą przenieść 40 ml tłuszczu lub oleju z dna próbki do probówki wirówkowej.
- Próbkę wiruje się przez 10 minut przy 4 000 obr./min.
- Jeżeli tłuszcz jest zestalony po odwirowaniu, należy go ogrzewać w suszarce aż do uzyskania postaci płynnej.
- Wirowanie należy powtórzyć przez 5 minut przy 4 000 obr./min.
- Małą łyżką lub łopatką laboratoryjną przenieść połowę zdekantowanych zanieczyszczeń na szkiełka mikroskopowe w celu zbadania. Jako środek zamykający zaleca się glicerynę.
- Pozostałe zanieczyszczenia wykorzystuje się do przygotowania osadu w sposób opisany w pkt 2.1.3.4.3 tiret pierwsze.

Ten sam protokół, z wyjątkiem tiret pierwszego i czwartego, stosuje się do przygotowania próbek składających się z oleju.

#### 2.1.3.4. Przygotowanie próbek innych niż tłuszczu lub oleju

##### 2.1.3.4.1. Pobieranie podpróbek i rozdrabnianie: z co najmniej 50 g próbki należy utworzyć podpróbę do analizy, a następnie rozdrobnić.

2.1.3.4.2. Przygotowanie surowca: należy przygotować co najmniej 5 g porcję rozdrobnionej podpróbki. Należy ją przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje.

2.1.3.4.3. Pojedyncza sedymentacja przy użyciu tetrachloroetylenu w celu wykrycia składników pochodzenia zwierzęcego innych niż pochodzących z bezkręgowców lądowych.

— Ekstrakcja i przygotowanie osadu:

porcję rozdrobnionej podpróbki o masie 10 g (z dokładnością do 0,01 g) umieszcza się w rozdzielaczu lub zlewce osadowej ze stożkowym dnem i dodaje się 50 ml tetrachloroetylenu. Porcję umieszczoną w rozdzielaczu ogranicza się do 3 g w przypadku mączki rybnej lub innych czystych produktów zwierzęcych, składników mineralnych lub premiksów, które wytwarzają więcej niż 10 % osadu. Mieszaninę należy wstrząsać energicznie przez co najmniej 30 sekund i ostrożnie dodać kolejne 50 ml tetrachloroetylenu, zmywając wewnętrzną powierzchnię rozdzielacza, aby usunąć wszelkie przylegające cząstki. Otrzymałą mieszaninę należy pozostawić na co najmniej 5 minut przed oddzieleniem osadu poprzez otwarcie kranu.

W przypadku użycia zlewki osadowej ze stożkowym dnem mieszaninę należy energicznie mieszać przez co najmniej 15 sekund, a wszelkie cząstki przylegające do ścianek zlewki należy ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując co najmniej 10 ml czystego tetrachloroetylenu. Mieszaninę należy pozostawić na 3 minuty, a następnie mieszać ponownie przez 15 sekund, a wszelkie cząstki przylegające do ścianek zlewki należy ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując co najmniej 10 ml czystego tetrachloroetylenu. Otrzymałą mieszaninę należy pozostawić na co najmniej 5 minut, a następnie usunąć płynną frakcję poprzez staranną dekantację, przy czym należy uważać, aby nie utracić części osadu.

Osad należy zebrać na bibule filtracyjnej umieszczonej w lejku, aby umożliwić oddzielenie pozostałego trójchloroetylenu, unikając osadzania się tłuszczu w osadzie. Osad należy osuszyć. Zaleca się następnie zważyć osad (z dokładnością do 0,001 g) w celu kontroli etapu sedymentacji. Na koniec osad należy przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje, chyba że przesiewania nie uznaje się za konieczne.

— Ekstrakcja i przygotowanie flotatu:

po odzyskaniu osadu metodą opisaną powyżej, w rozdzielaczu powinny pozostać dwie fazy: faza płynna składająca się z tetrachloroetylenu oraz faza stała utworzona z materiału flotacyjnego. Ta faza stała jest flotatem i należy ją odzyskać poprzez całkowite odlanie tetrachloroetylenu z rozdzielacza przez otwarcie kranu. Poprzez odwrócenie rozdzielacza flotat przenosi się na dużą płytkę Petriego i suszy powietrzem w okapie wyciągowym. Należy go przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje.

— Stosowanie odczynników barwiących:

w celu ułatwienia poprawnej identyfikacji składników pochodzenia zwierzęcego, podczas przygotowania próbki laborant może używać odczynników barwiących zgodnie z wytycznymi wydanymi przez EURL-AP i opublikowanymi na jego stronie internetowej.

W przypadku użycia do barwienia osadu roztworu czerwieni alizarynowej stosuje się następujący protokół:

— wysuszony osad przenieść do szklanej probówki i dwukrotnie przepłukać stosując około 5 ml etanolu (za każdym razem stosować wstrząsarkę przez 30 s, rozpuszczalnik pozostawić na około 1 min 30 s do osadzenia i następnie go odlać).

— Osad wybielić przez dodanie co najmniej 1 ml roztworu podchlorynu sodowego. Pozwolić na przebieg reakcji przez 10 minut. Probówkę napełnić wodą, poczekać 2–3 minuty na osadzenie się osadu, a wodę z zawieszonymi cząstkami delikatnie odlać.

— Osad przepłukać jeszcze dwukrotnie około 10 ml wody (za każdym razem stosować wstrząsarkę przez 30 s, pozostawić do osadzenia i odlać wodę).

— Dodać 2 do 10 kropli roztworu czerwieni alizarynowej, a następnie mieszaninę wymieszać wstrząsarką. Pozwolić na przebieg reakcji przez 30 s i dwukrotnie przepłukać zabarwiony osad stosując około 5 ml etanolu, a następnie przepłukać go raz acetonem (za każdym razem stosować wstrząsarkę przez 30 s, rozpuszczalnik pozostawić na około 1 min do osadzenia i następnie go odlać).

— Zabarwiony osad należy osuszyć.

2.1.3.4.4. Podwójna sedymentacja przy użyciu eteru naftowego/tetrachloroetyleny w celu wykrycia składników pochodzących z bezkręgowców lądowych.

Wszystkie czynności wykonuje się w szklanym stożkowym rozdzielaczu o pojemności 250 ml, jak opisano w pkt 2.1.2.2 tiret czwarte.

- Porcję 10 g (z dokładnością do 0,01 g) zmielonej podpróbki należy przenieść do rozdzielacza i najpierw poddać pojedynczej sedymentacji przy użyciu tetrachloroetyleny, jak opisano w pkt 2.1.3.4.3, w tym odzyskowi osadu na bibule filtracyjnej umieszczonej na rozdzielaczu. Osad ten można wykorzystywać jak osad uzyskany przy zastosowaniu metody z pkt 2.1.3.4.3.
- Niewielką ilość tetrachloroetyleny odsączonego wraz z osadem należy przenieść do cylindra pomiarowego. Otwierając kran rozdzielacza, cylinder pomiarowy należy napełnić dalej do uzyskania 30 ml tetrachloroetyleny. Po osiągnięciu tej objętości należy zamknąć kran.
- Zebraną ilość tetrachloroetyleny zastępuje się dodaniem do rozdzielacza 30 ml eteru naftowego o temperaturze wrzenia 40–60 °C. Zawartość rozdzielacza należy dokładnie wymieszać w celu uzyskania mieszaniny eteru naftowego (30 %) i tetrachloroetyleny (70 %) (o gęstości ok. 1,26 g.cm<sup>-3</sup>). Pozostawić materiał do osadzenia przez 10 minut. Wydzielą się dwie nowe frakcje: drugi osad i flotat końcowy (< 1,26 g.cm<sup>-3</sup>). Drugi osad należy odzyskać na płytce Petriego (lub bibule filtracyjnej umieszczonej na rozdzielaczu) poprzez otwarcie kranu do momentu gdy w rozdzielaczu pozostanie tylko niewielka ilość mieszaniny rozpuszczalników i flotatu końcowego. Pozostałą ciecz i flotat końcowy należy zebrać oddzielnie na bibułę filtracyjną umieszczoną na rozdzielaczu. Ścianę rozdzielacza należy spłukać strumieniem eteru naftowego w celu zebrania całego materiału z flotatu końcowego. Flotat końcowy należy pozostawić do wyschnięcia. Flotat końcowy należy przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje w celu wykrycia składników pochodzących z bezkręgowców lądowych, chyba że przesiewania nie uznaje się za konieczne.

2.1.4. *Badanie mikroskopowe*

2.1.4.1. Przygotowanie preparatów

Preparaty mikroskopowe przygotowuje się z osadu i, w zależności od wyboru laboranta, z flotatu albo z surowca. W stosownych przypadkach, wyłącznie w celu wykrycia składników pochodzących z bezkręgowców lądowych, należy również przygotować preparaty z flotatu końcowego uzyskanego zgodnie z opisem w pkt 2.1.3.4.4. Należy przygotować dwie uzyskane frakcje (drobną i gruboziarnistą). Naważki z frakcji rozprowadzone w preparatach muszą być reprezentatywne dla całej frakcji.

Należy przygotować wystarczającą liczbę preparatów w celu zapewnienia pełnej realizacji protokołu badawczego określonego w pkt 2.1.4.2.

Preparaty mikroskopowe montuje się przy użyciu odpowiedniego środka zamykającego zgodnie ze standardową procedurą operacyjną ustaloną przez EURL-AP i opublikowaną na jego stronie internetowej. Preparaty należy przykryć szkiełkami nakrywkowymi.

2.1.4.2. Diagram obserwacji w celu wykrycia cząstek zwierzęcych w mieszkach paszowych, materiałach paszowych i premiksach.

Preparaty mikroskopowe bada się zgodnie z diagramami obserwacji przedstawionymi na schematach 1 i 2.

Przy użyciu mikroskopu złożonego przeprowadza się obserwację mikroskopową osadu i, w zależności od wyboru laboranta, flotatu lub surowca. Dodatkowo w celu wykrycia składników pochodzących z bezkręgowców lądowych należy również przeprowadzić obserwację flotatu końcowego uzyskanego zgodnie z opisem w pkt 2.1.3.4.4 przedstawionym na schemacie 3. W przypadku frakcji gruboziarnistych poza mikroskopem złożonym można dodatkowo użyć mikroskopu stereoskopowego. Każdy preparat należy obserwować w całości, stosując różne powiększenia. Szczegółowe wyjaśnienia dotyczące sposobu korzystania z diagramów są szczegółowo określone w standardowej procedurze operacyjnej ustalonej przez EURL-AP i opublikowanej na jego stronie internetowej.

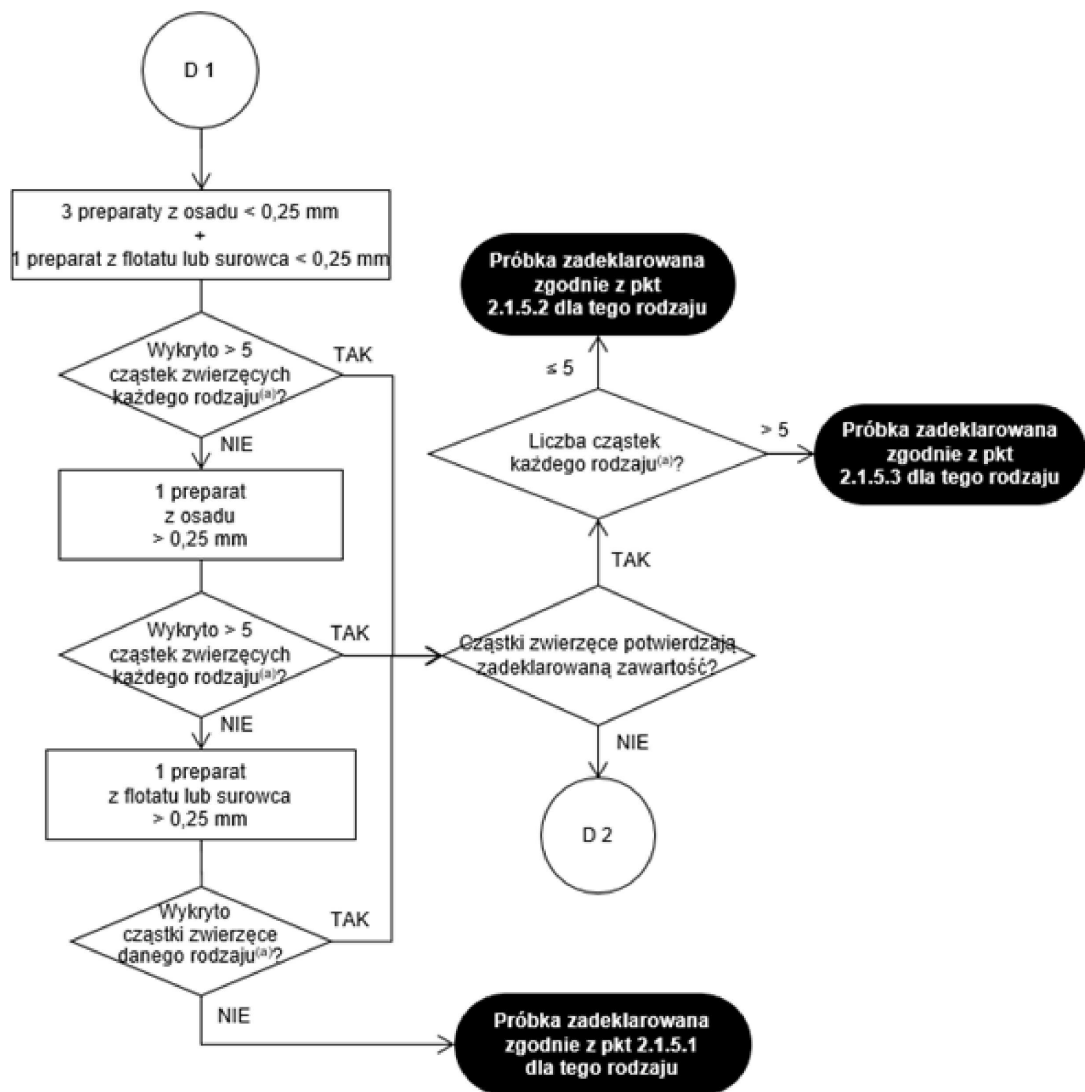
Należy ściśle przestrzegać minimalnej liczby preparatów, jakie zgodnie z diagramami obserwacji należy obserwować na każdym etapie, chyba że cały podzielony na frakcje materiał nie pozwala osiągnąć wymaganej liczby preparatów, na przykład w przypadku, gdy nie uzyskano osadu. Nie można stosować więcej niż 6 preparatów na jedno oznaczenie do rejestrowania liczby cząstek stałych.

Jeżeli sporządza się dodatkowe preparaty na flotacie lub na surowcu z zastosowaniem bardziej specyficznego środka zamykającego o właściwościach barwiących, określonego w pkt 2.1.2.1.4, aby dokładniej scharakteryzować struktury (np. pióra, włosy, cząstki tkanki mięsnej lub krwi), które wykryto w preparatach przygotowanych przy pomocy innych środków zamykających, określonych w pkt 2.1.2.1.3, liczba cząstek stałych jest liczona na podstawie liczby preparatów na jedno oznaczenie, nieprzekraczającej 6, z uwzględnieniem dodatkowych preparatów z bardziej specyficznym środkiem zamykającym. Dodatkowych preparatów przygotowanych z flotatu końcowego uzyskanego zgodnie z opisem w pkt 2.1.3.4.4 w celu wykrycia składników pochodzących z bezkręgowców lądowych nie uwzględnia się przy identyfikacji innych gatunków (kręgowców lądowych i ryb).

W celu ułatwienia identyfikacji rodzaju oraz pochodzenia cząstek laborant może wykorzystać narzędzia pomocnicze, takie jak systemy wspomagające podejmowanie decyzji, biblioteki obrazów oraz próbki referencyjne.

Schemat 1

Diagram obserwacji po pojedynczej sedymentacji przy użyciu tetrachloroetylenu w celu wykrycia cząstek zwierzęcych innych niż pochodzące z bezkręgowców lądowych w mieszankach paszowych, materiałach paszowych i premiksach na potrzeby pierwszego oznaczenia

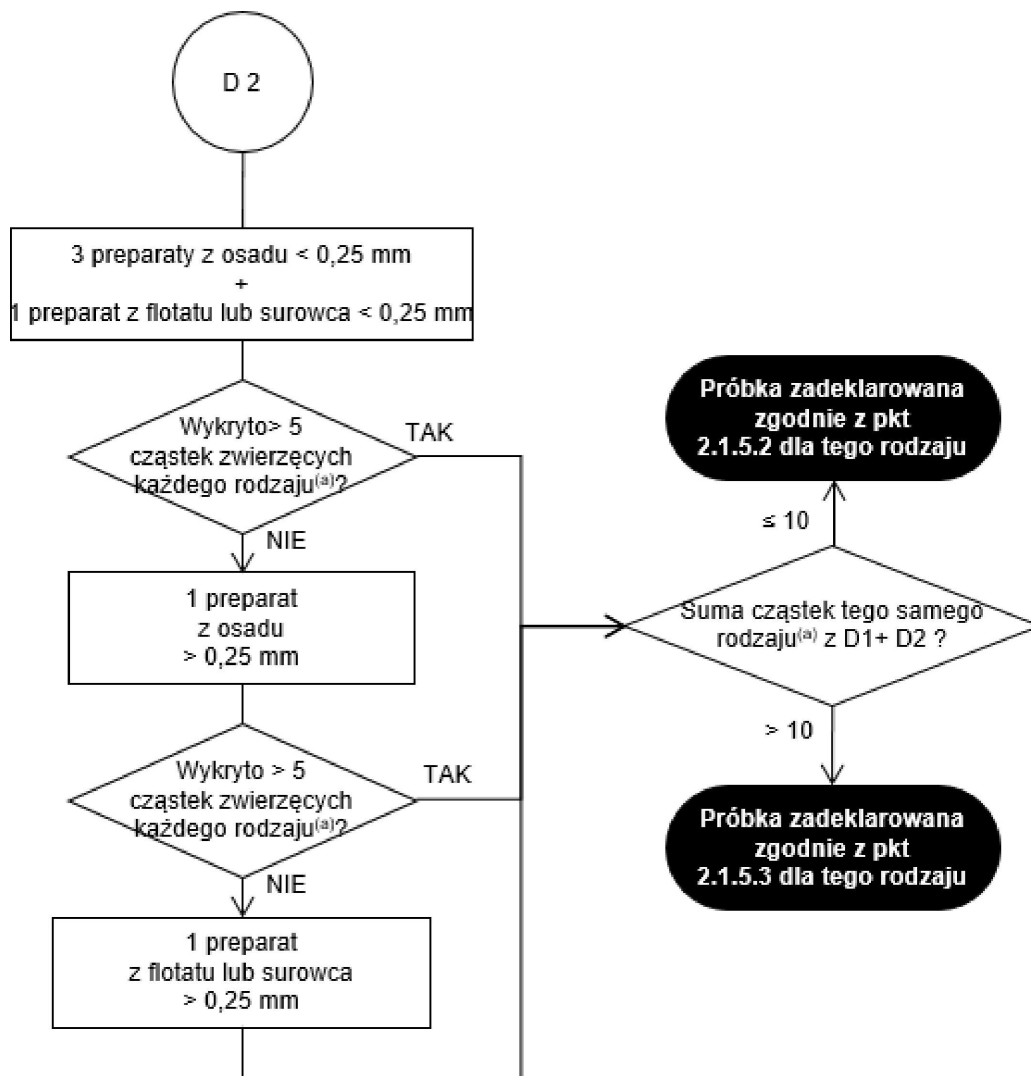


(„D1” i „D2” odnoszą się do pierwszego i drugiego oznaczenia; <sup>(a)</sup>: kręgowce lądowe, ryby)



Schemat 2

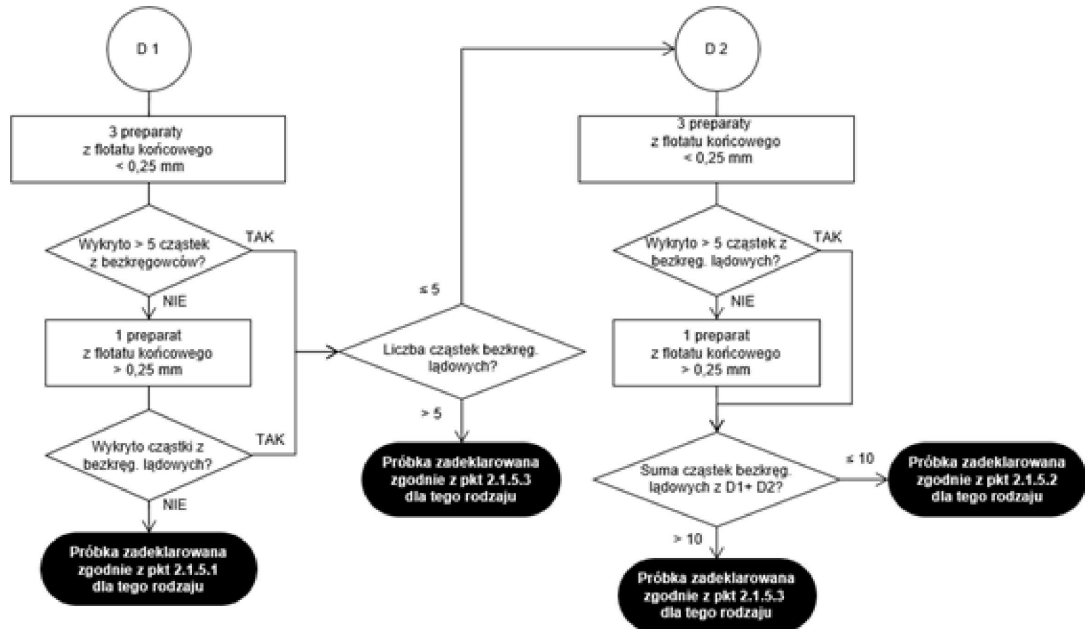
Diagram obserwacji po pojedynczej sedymentacji przy użyciu tetrachloroetylenu w celu wykrycia cząstek zwierzęcych innych niż pochodzące z bezkręgowców lądowych w mieszankach paszowych, materiałach paszowych i premiksach na potrzeby drugiego oznaczenia



(„D1” i „D2” odnoszą się do pierwszego i drugiego oznaczenia; <sup>(a)</sup>: kręgowce lądowe, ryby)

Schemat 3

**Diagram obserwacji po podwójnej sedymentacji przy użyciu eteru naftowego/tetrachloroetylenu w celu wykrycia składników pochodzących z bezkręgowców lądowych w mieszanekach paszowych, materiałach paszowych i premiksach**



(D1 i D2 odnoszą się do pierwszego i drugiego oznaczenia)

#### 2.1.4.3. Liczba oznaczeń

Oznaczenia wykonuje się na różnych podpróbkach o masie po 50 g każda.

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia wykonanego zgodnie z diagramem obserwacji przedstawionym na schemacie 1 lub, w stosownych przypadkach, schemacie 3 nie wykryto żadnej cząstki zwierzęcej, dodatkowe oznaczenie nie jest konieczne, a wynik analizy przekazuje się, stosując sformułowania określone w pkt 2.1.5.1.

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia wykonanego zgodnie z diagramem obserwacji przedstawionym na schemacie 1 wykryto cząstkę zwierzęcą lub cząstki zwierzęce danego rodzaju (tj. kręgowca lądowego lub ryby), a rodzaj wykrytych cząstek potwierdza deklarowaną zawartość próbki, drugie oznaczenie nie jest konieczne. Jeżeli liczba cząstek zwierzęcych danego rodzaju wykrytych podczas pierwszego oznaczenia jest wyższa niż 5, wynik analizy przekazuje się dla każdego rodzaju zwierzęcia oddzielnie, stosując sformułowania określone w pkt 2.1.5.3. W przeciwnym wypadku wynik analizy przekazuje się dla każdego rodzaju zwierzęcia oddzielnie, stosując sformułowania określone w pkt 2.1.5.2.

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia wykonanego zgodnie z diagramem obserwacji przedstawionym na schemacie 3 wykryto ponad 5 cząstek zwierzęcych pochodzących z bezkręgowców lądowych, drugie oznaczenie nie jest konieczne, a wynik analizy dla tego rodzaju zwierzęcia przekazuje się, stosując sformułowania określone w pkt 2.1.5.3.

We wszystkich innych przypadkach, w tym gdy do laboratorium nie dostarczono żadnej deklaracji zawartości, przeprowadza się drugie oznaczenie z nowej podpróbki. Jeżeli w wyniku drugiego oznaczenia wykonanego zgodnie z diagramem obserwacji przedstawionym na schemacie 2 lub, w stosownych przypadkach, schemacie 3 suma cząstek zwierzęcych danego rodzaju wykrytych podczas dwóch oznaczeń jest wyższa niż 10, wynik analizy przekazuje się dla każdego rodzaju zwierzęcia oddzielnie, stosując sformułowania określone w pkt 2.1.5.3. W przeciwnym wypadku wynik analizy przekazuje się dla każdego rodzaju zwierzęcia oddzielnie, stosując sformułowania określone w pkt 2.1.5.2.

### 2.1.5. Przedstawianie wyników

Przekazując wyniki, laboratorium musi podać, jakiego typu materiał poddano analizie (osad, flotat, flotat końcowy czy surowiec). W sprawozdaniu należy wyraźnie wskazać, ile oznaczeń wykonano oraz czy nie przeprowadzono przesiewu frakcji przed sporządzeniem preparatu zgodnie z pkt 2.1.3.4.3 tiret pierwsze akapit trzeci lub pkt 2.1.3.4.4 tiret trzecie.

Sprawozdanie laboratoryjne musi zawierać co najmniej informacje o występowaniu składników pochodzących z kręgowców lądowych i z ryb.

Sprawozdania dotyczące poszczególnych przypadków należy składać w następujący sposób.

#### 2.1.5.1. Nie wykryto żadnych cząstek zwierzęcych danego rodzaju:

- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce nie wykryto żadnych cząstek pochodzących z kręgowców lądowych.«
- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce nie wykryto żadnych cząstek pochodzących z ryb.«
- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce nie wykryto żadnych cząstek pochodzących z bezkręgowców lądowych.«

#### 2.1.5.2. Od 1 do 5 cząstek zwierzęcych danego rodzaju wykrytych po wykonaniu tylko jednego oznaczenia lub od 1 do 10 cząstek danego rodzaju wykrytych w przypadku dwóch oznaczeń (liczba wykrytych cząstek jest poniżej decyzyjnej wartości granicznej ustanowionej w standardowej procedurze operacyjnej (SOP) ustalonej przez EURL-AP i opublikowanej na jego stronie internetowej):

W przypadku gdy wykonano tylko jedno oznaczenie:

- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto nie więcej niż 5 cząstek pochodzących z kręgowców lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi, inne (proszę określić)]. Ta niewielka obecność jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla tej metody mikroskopowej.«
- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto nie więcej niż 5 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolith, skrzela, inne (proszę określić)]. Ta niewielka obecność jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla tej metody mikroskopowej.«

W przypadku gdy wykonano dwa oznaczenia:

- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń nie więcej niż 10 cząstek pochodzących z kręgowców lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi, inne (proszę określić)]. Ta niewielka obecność jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla tej metody mikroskopowej.«
- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń nie więcej niż 10 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolith, skrzela, inne (proszę określić)]. Ta niewielka obecność jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla tej metody mikroskopowej.«
- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń nie więcej niż 10 cząstek pochodzących z bezkręgowców lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [fragmenty kutykuli, narządy gębowe, mięśnie, elementy układu tchawkowego, inne (proszę określić)]. Ta niewielka obecność jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla tej metody mikroskopowej.«

Ponadto:

- W przypadku wstępnego przesiewu próbki w sprawozdaniu laboratoryjnym należy określić, w jakiej frakcji (sitowej, granulowanej czy ziarnistej) wykryto cząstki zwierzęce, ponieważ wykrycie cząstek zwierzęcych tylko we frakcji sitowej może wynikać z zanieczyszczenia środowiskowego.

- W przypadku wykrycia jedynie cząstek zwierzęcych, których nie można sklasyfikować ani jako kręgowce lądowe, ani jako ryby (np. włókna mięśniowe), w sprawozdaniu należy wskazać, że wykryto jedynie takie cząstki zwierzęce i że nie można wykluczyć, iż pochodzą one z kręgowców lądowych.

2.1.5.3. Wykryto więcej niż 5 cząstek zwierzęcych danego rodzaju po wykonaniu tylko jednego oznaczenia lub wykryto więcej niż 10 cząstek danego rodzaju w przypadku dwóch oznaczeń:

W przypadku gdy wykonano tylko jedno oznaczenie:

- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto więcej niż 5 cząstek pochodzących z kręgowców lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi, inne (proszę określić)].«
- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto więcej niż 5 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolit, skrzela, inne (proszę określić)].«
- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto więcej niż 5 cząstek pochodzących z bezkręgowców lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [fragmenty kutykuli, narządy gębowe, mięśnie, elementy układu tchawkowego, inne (proszę określić)].«

W przypadku gdy wykonano dwa oznaczenia:

- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń więcej niż 10 cząstek pochodzących z kręgowców lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi, inne (proszę określić)].«
- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń więcej niż 10 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolit, skrzela, inne (proszę określić)].«
- »Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń więcej niż 10 cząstek pochodzących z bezkręgowców lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako ... [fragmenty kutykuli, narządy gębowe, mięśnie, elementy układu tchawkowego, inne (proszę określić)].«

Ponadto:

- W przypadku wstępnego przesiewu próbki w sprawozdaniu laboratoryjnym należy określić, w jakiej frakcji (sitowej, granulowanej czy ziarnistej) wykryto cząstki zwierzęce, ponieważ wykrycie cząstek zwierzęcych tylko we frakcji sitowej może wynikać z zanieczyszczenia środowiskowego.
  - W przypadku wykrycia jedynie cząstek zwierzęcych, których nie można sklasyfikować ani jako kręgowce lądowe, ani jako ryby (np. włókna mięśniowe), w sprawozdaniu należy wskazać, że wykryto jedynie takie cząstki zwierzęce i że nie można wykluczyć, iż pochodzą one od kręgowców lądowych.”
-