Приложение № 6

к Постановлению Правительства

№ 686 от 13 сентября 2012 г.

**МЕТОДЫ АНАЛИЗА**

**по определению компонентов животного происхождения**

**для официального контроля кормов**

**1. УСЛОВИЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОЦЕНКИ ПУТЕМ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КОРМАХ**

**1.1. Цель и область применения**

Настоящие условия используются для обнаружения компонентов животного происхождения, определяемых как продукты переработки туш или частей тела млекопитающих, домашних птиц и рыб, в корме на основании микроскопического исследования в рамках скоординированной программы инспекции в области кормления животных.

Определение компонентов животного происхождения в кормах осуществляется посредством оптической микроскопии или цепной реакции полимеразы (PCR) в соответствии с положениями, установленными в настоящем приложении.

Данные два метода делают возможным обнаружение наличия компонентов животного происхождения в сырье для кормов и комбикормов. Однако они не делают возможным расчет количества данных компонентов в сырье для кормов и комбикормов. Оба метода имеют предел обнаружения до 0,1% г/г.

Метод PCR делает возможным идентификацию таксономической группы компонентов животного происхождения, присутствующих в сырье для кормов и комбикормов.

В зависимости от типа корма в процессе тестирования данные методы могут быть использованы в ходе одного единственного операционного протокола или по отдельности либо вместе в соответствии со стандартными операционными процедурами, установленными референтной лабораторией Европейского союза для обнаружения животных белков в корме для животных, опубликованными на ее официальной веб-странице.

**1.2. Чувствительность**

В зависимости от компонентов животного происхождения возможно обнаружение очень малых количеств (< 0,1%) в кормах.

**1.3. Принцип применения**

Для обнаружения используется репрезентативный образец, отобранный в соответствии с указаниями приложения № 1, который прошел соответствующую подготовку. Протокол, описанный в пункте 1.9 настоящего приложения, подходит для обработки корма с низким содержанием влаги.

Корма с влажностью, превышающей 14%, высушиваются до начала обработки. Корма и специальное сырье, например, жиры или масла, подвергаются специальной обработке, предусмотренной в пункте 1.9 настоящего приложения.

Компоненты животного происхождения определяются на основании типичных характеристик, идентифицируемых микроскопическим исследованием, например, мышечных волокон и других частиц мяса, хряща, костей, рогов, волос, щетины, крови, перьев, яичной скорлупы, костей и рыбной чешуи.

Определение должно осуществляться как для отсеянных фракций, в соответствии с положениями, описанными в подпункте 1.6.1, а также концентрированных осадков образца, в соответствии с положениями подпункта 1.6.2 настоящего приложения.

**1.4. Применяемые реагенты**

1.4.1. Используемые агенты

1.4.1.1 Тетрахлорэтилен весом 1,62.

1.4.1.2 Ализарин красный разбавляют 2,5 мл 1М соляной кислоты в 100 мл воды и добавляют 200 мг раствора ализарина красного.

1.4.1.3. Хлоргидрат (водный раствор, 60% вес/объем).

1.4.1.4. Раствор золы (NaOH 2,5% в/о или КОН 2,5% вес/объем) для отсеивающих фракций.

1.4.1.5. Парафиновое масло или глицерин с вязкостью: 68-81 для микроскопического исследования осадка.

1.4.1.6 Norland ® Optical Adhesive 65 (вязкость: 1 200 cP) или смола с эквивалентными свойствами для подготовки постоянных пластинок.

1.4.1.7 Реактив Фелинга, подготовленный до использования в равных частях 1/1 двух базовых растворов А и В: Раствор А: растворить 6,9 г сульфата  меди   пятиводного (II) в 100 мл воды. Раствор В: растворить 34,6 г тетрагидрат тартрата калия-натрия и 12 г NaOH в 100 мл воды.

1.4.1.8 Тетраметилбензидин/Пероксид водорода – растворить 1 г 3,3’,5,5’ тетраметилбензидина в 100 мл уксусной кислоты ледяной и 150 мл воды. До использования размешать четыре части данного раствора тетраметилбензидина с одной частью пероксида водорода 3%.

1.4.2. Раствор для промывания

1.4.2.1. Алкоголь, 96%.

1.4.2.2. Ацетон.

1.4.3. Концентрированный агент

1.4.3.1. Тетрахлорэтилен с плотностью 1,62.

1.4.4. Реагенты для окрашивания

1.4.4.1. Раствор йода/йодистый калий. Растворяют 2 г йодистого калия в 100 мл воды и добавляют 1 г йода, часто помешивая.

1.4.4.2. Ализарин красный. Разбавляют 2,5 мл 1М соляной кислоты в 100 мл воды и добавляют 200 мг раствора ализарина красного.

1.4.4.3. Раствор цистина. 2 г ацетатного свинца, 10 г NaOH/100 мл H2O.

1.4.4.4. Раствор йода/йодистый калий - растворенный в этаноле 70%.

1.4.5. Отбеливающий реагент

1.4.5.1 Коммерческий раствор гипохлорида натрия с концентрацией 9-14% активного хлора.

**1.5. Оборудование и аксессуары**

1.5.1. Аналитические весы, точностью 0,001 г, за исключением концентрированного осадка: 0,001 г.

1.5.2. Устройство для измельчения (мельница или ступка, особенно для корма, содержащего > 15% жира, обнаруженного при анализе).

1.5.3. Решето с квадратными отверстиями с максимальной шириной 0,25 мм и длиной 1 мм.

1.5.4. Воронка для разделения или лабораторный стакан для сцеживания с коническим дном.

1.5.5. Стереоскопический микроскоп (увеличение не менее чем в 40 раз).

1.5.6. Современный микроскоп (увеличение не менее чем в 400 раз) проходящий свет или поляризованный свет.

1.5.7. Стандартная лабораторная посуда

1.5.8. Оборудование для подготовки пластинок: классические стекла для микроскопа, трубчатые стекла, стекла с покрытием размером 20 х 20 мм, пинцет, тонкий шпатель.

Все оборудование тщательно очищено. Воронка для разделения и стеклянная посуда промываются в посудомоечной машине. Решето необходимо очищать жесткой зубной щеткой.

**1.6. Процедура подготовки**

Во избежание перекрестного заражения в лаборатории, все оборудование многократного пользования тщательно очищается перед использованием. Части воронки для разделения разбираются перед очисткой. Части воронки для разделения и посуда промываются вручную, а затем в посудомоечной машине. Решето очищается жесткой синтетической зубной щеткой. Рекомендуется финальная очистка решета с помощью ацетона и сжатого воздуха после просеивания крупного сырья, как, например, рыбная мука.

Если обе фракции анализировались как отдельные образцы, кормовые гранулы предварительно просеиваются.

Не менее 50 г образца рассматриваются, в случае необходимости, осторожно перемалываются с помощью устройства для измельчения в целях достижения соответствующей структуры. Из измельченного материала отбираются две представительные части, одна – для просеянной фракции, не менее 5 г, имея в виду отметки подпункта 1.6.1 настоящего приложения, и одна – для концентрированного осадка, не менее 5 г, имея в виду отметки подпункта 1.6.2 настоящего приложения. Для идентификации применяют дополнительно окрашивание реагентом для окрашивания в соответствии с положениями подпункта 1.6.3 настоящего приложения.

Чтобы указать характер животного белка и происхождение частиц может быть использована система поддержки для принятия решения типа ARIES и могут быть документированы ориентировочные образцы.

1.6.1 Для анализа образцов, иных чем жиры и масла

Образцы влажностью > 14 % высушиваются перед обработкой.

Рекомендуется предварительно просеять через 1 мм корма в форме гранул или зерен и затем подготавливаются и анализируются обе фракции в качестве различных образцов.

Разделение на подобразцы и измельчение: минимум 50 г образца представляют собой подобразцы для анализа и дальнейшего измельчения.

1) Извлечение и подготовка осадка: часть 10 г с точностью до 0,01 г измельченного подобразца переносится в воронку для разделения или в стакан для сцеживания с коническим дном и добавляется 50 мл тетрахлорэтилена. Часть, помещенная в воронку, ограничивается 3 г, в случае рыбной муки или других продуктов чистого животного происхождения, минеральные ингредиенты или премиксы, оставляющие осадок более 10%.

Смесь энергично встряхивается минимум 30 секунд и аккуратно добавляется еще 50 мл тетрахлорэтилена в то время, как промывается внутренняя поверхность воронки для удаления любых следов частиц. Полученную смесь отставляют минимум на пять минут до разделения осадка посредством открытия крана.

2) Если используется стакан для сцеживания с коническим дном, смесь энергично встряхивается в течение 15 секунд, частицы, оставшиеся на стенках стакана, тщательно промываются с внутренней поверхности минимум 10 мл чистого тетрахлорэтилена.

Смесь отставляют на 3 минуты, затем снова встряхивают в течение 15 секунд, а частицы, оставшиеся на стенках стакана, тщательно промываются с внутренней поверхности минимум 10 мл чистого тетрахлорэтилена. Полученную смесь отставляют минимум на 5 минут, затем удаляется жидкая часть, и удаляется посредством осторожного сцеживания, чтобы из осадка ничего не было утеряно.

3) Осадок высушивается и взвешивается на весах с точностью до 0,001 г. Если более 5% осадка составляют частицы > 0,50 мм, они просеиваются при 0,25 мм, и изучаются полученные две фракции.

4) Извлечение и подготовка флотационного шлама: после восстановления осадка путем вышеописанного метода, должны остаться две фазы в воронке для разделения: одна жидкая, состоящая в тетрахлорэтилене, и одна твердая, состоящая из материала, который плавает. Данная твердая фаза является флотационным шламом, который восстанавливается, вылив весь тетрахлорэтилен из воронки посредством открытия крана. Путем переворачивания воронки для разделения флотационный шлам переходит в большую чашку Петри и высушивается на воздухе в вытяжном зонте. Если более 5% флотационного шлама составляют частицы> 0,50 мм, они просеиваются при 0,25 мм, и изучаются полученные две фракции.

5) Подготовка сырья: подготавливается одна часть минимум 5 г измельченного подобразца. Если более 5% сырья составляют частицы > 0,50 мм, они просеиваются при 0,25 мм, и изучаются полученные две фракции.

1.6.2. Идентификация компонентов животного происхождения из просеянных фракций

Образец не менее 5 г просеивают через решето на две фракции.

Доля (доли) просеянной (просеянных) с большими частицами (или представительная часть фракции) наносится тонким слоем на подходящую поддержку и исследуется систематически под стереомикроскопом с различными увеличениями для выявления компонентов животного происхождения.

Подготовленные стекла с фракцией (фракциями) с мелкими частицами проверяются систематически под современным микроскопом с различными увеличениями для выявления компонентов животного происхождения.

1.6.3. Идентификация компонентов животного происхождения из концентрированного осадка

Не менее 5 г, взвешенные на весах с точностью до 0,001 г, образца переносят в делительную воронку или лабораторный стакан для сцеживания с коническим дном и обрабатывают не менее чем 50 мл тетрахлорэтилена. Смесь взбалтывается или перемешивается несколько раз.

1) При использовании закрытой воронки для разделения, осадок оставляют на не менее чем три минуты перед отделением. Повторно взбалтывают и осадок отстаивают в течение не менее трех минут.

Отделяют осадок снова.

2) При использовании открытого лабораторного стакана осадок оставляют, по крайней мере, на пять минут перед отделением.

Общий осадок сушат и взвешивают на весах с точностью до 0,001 г. Взвешивание требуется только при необходимости определения. Если осадок содержит много крупных частиц, его просеивают через решето на две фракции.

Сушеный осадок исследуют под стереомикроскопом и с помощью современного микроскопа для обнаружения костных компонентов.

1.6.4 Подготовка образцов из жиров и масел

Для подготовки образцов из жиров и масел применяется следующая процедура:

1) если жир твердый, он нагревается в печи до жидкого состояния;

2) с помощью пипетки 40 мл жира или масла перемещают из внутренней части образца в барабан центрифуги;

3) подвергается центрифугированию в течение 10 мин при   
4000 об/мин.;

4) если жир становится твердый после центрифугирования, нагреть в печи до жидкого состояния;

5) повторить центрифугирование в течение 5 минут при 4000 об/мин.;

6) с помощью маленькой ложки или шпателя половину отстоявшихся примесей перенести на рассмотрение на микроскопическую пластину – рекомендуется использование глицерола в качестве средства укладки;

1.6.5. Использование включенных агентов и реагентов для окрашивания

Для облегчения идентификации микроскопом микроскопических компонентов животного происхождения могут быть использованы включенные агенты и специальные реагенты для окрашивания.

Гидрохлорид: путем осторожного нагревания клеточные структуры видны более четко в результате того, что гранулы крахмала застывают, а нежелательное клеточное содержимое удаляется.

Щелок: как гидроксид натрия, так и гидроксид калия проясняют содержимое корма, что облегчает обнаружение мышечных волокон, волос или других кератиновых структур.

Парафиновое масло и глицерин: костные соединения могут быть четко идентифицированы в составе включенных агентов, потому что большинство пробелов остаются заполненными воздухом и выглядят, как черные дыры примерно от 5 до 15 мкм.

Раствор йода/йодированного калия: используется для определения крахмала сине-фиолетового цвета и белка желто-оранжевого цвета. При необходимости, раствор может быть отделен.

Раствор красного ализарина: окрас костей, в том числе костей и чешуи рыбы, красный, розовый. Перед высушиванием осадка, в соответствии с положениями подпункта 1.6.2 настоящего приложения, весь осадок перемещают в стеклянный сосуд и дважды промывают 5 мл спирта, каждый раз используя шейкер, а растворитель оставляют в течение одной минуты и устраняют.

Прежде чем использовать этот реагент для окраски, осадок обесцвечивают, добавляя не менее 1 мл раствора гипохлорита натрия. Допускают, чтобы реакция продолжалась в течение 10 минут. Сосуд заполняют водой, ожидают 2-3 минуты, чтобы осадок отсеялся, а воду и частицы суспензии устраняют.

Осадок промывают еще два раза примерно с 10 мл воды, каждый раз используется шейкер, а затем оставляют и далее исключают воду. В зависимости от суммы остатка, добавляют от двух до десяти или больше капель раствора ализарина красного. Смесь встряхивают и ожидают реакции в течение нескольких секунд.

Цветной осадок дважды промывают 5 мл спирта, затем один раз с ацетоном, каждый раз используя шейкер, растворитель оставляют в течение одной минуты и устраняют. После этого осадок готов для высушивания.

Реактивный цистин: путем тщательного нагревания компоненты, содержащие цистин, как, например, волосы, перья и т.д., становятся черно-коричневого цвета.

1.6.6. Исследование восприимчивых кормов, содержащих рыбную муку

Исследуют с помощью современного микроскопа в соответствии с положениями подпунктов 1.6.1 и 1.6.2 настоящего приложения, не менее одной пластины измельченной мелкой фракции и мелкой фракции осадка.

Если этикетка указывает на наличие рыбной муки в ингредиентах или подозревается или обнаружено присутствие рыбной муки в первоначальном исследовании, рассматривается не менее двух пластин мелкой измельченной фракции исходного образца, а также общая доля осадка.

1.6.7. Микроскопические пластинки подготавливаются из осадка и, в зависимости от выбора оператора, или из флотационного шлама или из сырья. В случае использования просеивания во время подготовки образцов, подготавливаются две фракции – тонкая и грубая.

Тестируемые части из фракций, растянутые на стеклах, должны быть представительными для всей фракции.

Микроскопические пластинки устанавливаются соответствующим средством для укладки в соответствии со стандартными оперативными процедурами, установленными референтной лабораторией Европейского союза для обнаружения животных белков в корме для животных, и опубликованными на ее официальной веб-странице. Пластинки покрываются покрывающими стеклами.

Микроскопические замечания осуществляются с использованием современного микроскопа на осадке и, в зависимости от выбора оператора, или на флотационном шламе, или на сырье. Стереоскопический микроскоп может быть использован дополнительно к современному микроскопу для грубых фракций. Каждое стекло рассматривается полностью при различных усилениях.

Минимальное количество стекол, которое должно изучаться на каждом этапе процедуры изучения, должно строго соблюдаться, за исключением случая, когда весь материал фракции не позволяет достичь предусмотренного количества стекол. Не изучается более 6 стекол для каждого определения.

Для облегчения идентификации природы и происхождения частиц, оператор может использовать поддерживающие инструменты, такие как система принятия решений, библиотека изображений и ориентировочные образцы.

1.6.8 Количество определений

Если вследствие первого определения, выполненного в соответствии с процедурой изучения, не обнаруживается ни одна частица животного происхождения определенной природы, как наземные животные или рыбы, нет необходимости в дополнительном определении.

Если вследствие первого определения, выполненного в соответствии с процедурой изучения, при необходимости, общее количество обнаруженных частиц животного происхождения определенной природы, как, например, наземные животные и рыбы, варьирует от 1 до 5, проводится второе определение, исходя из нового подобразца в 50 г.

Если вследствие второго определения количество обнаруженных частиц животного происхождения определенной природы варьирует от   
0 до 5, результат анализа сообщается с использованием терминологии, установленной в пункте 1.6 настоящего приложения, если нет, проводится третье определение, исходя из нового подобразца в 50 г.

В случае если вследствие первого и второго определения сумма частиц определенной природы, обнаруженных при двух определениях более 15, нет необходимости в дополнительном определении, а результат анализа сообщается напрямую с использованием терминологии, установленной в пункте 1.6 настоящего приложения. Если вследствие третьего определения сумма частиц животного происхождения определенной природы, обнаруженных в ходе трех определений, превышает 15, результат анализа сообщается с использованием терминологии, установленной в пункте 1.6 настоящего приложения.

**1.7. Расчет и оценка**

Компетентный санитарно-ветеринарный орган должен обеспечить, чтобы процедуры, описанные в настоящем пункте, использовались для всех официальных тестов в целях оценки количества, а не только наличия компонентов животного происхождения.

Расчет может быть сделан только в том случае, если компоненты животного происхождения содержат фрагменты костей.

Костные фрагменты наземных видов с теплой кровью, как, например, млекопитающие и птицы, могут отличаться от различных типов рыбных костей на микроскопической пластине, с помощью типичного недостатка. Доля состава животных компонентов в образце оценивается с учетом:

1) расчетной доли в % по весу костных фрагментов в концентрированном осадке; и

2) соотношения в % по весу кости в компонентах животного происхождения.

Для оценки исследуются, если возможно, не менее трех пластин и не менее пяти полей для каждой пластины. В комбикорме концентрированный осадок обычно содержит не только фрагменты костей наземных животных и рыбных костей, но и других частиц с высоким удельным весом, таких, как минералы, песок, одревесневшие фрагменты растений и другие.

1.7.1. Предполагаемый процент костных фрагментов

1. % костных фрагментов наземных животных = (S × c)/g;
2. % костных фрагментов и рыбьей чешуи = (S × d)/g,

где:

S = вес осадка в мг;

с = коэффициент поправки % для оцениваемой части костей наземных животных в осадке;

d = коэффициент поправки % для оцениваемой части рыбьих костей и чешуи из осадка;

g = вес образца для оседания в мг.

1.7.2. Ориентировочное значение составляющих животного происхождения

Если тип муки животного происхождения, присутствующей в образце, известен, можно оценить содержание:

1. расчетное содержание компонентов наземных животных продуктов:

(%) = (S × c)/(g × f) × 100;

1. расчетное содержание компонентов рыбной продукции:

(%) = (S × d)/(g × f) × 100,

где:

S = вес осадка в мг;

с= коэффициент поправки % для оцениваемой части сформированных костей наземных животных в осадке;

d = коэффициент поправки % для оцениваемой части рыбьих костей и чешуи из осадка;

f = коэффициент поправки на долю сформированных костей животного происхождения в исследуемом образце;

g = вес образца для оседания в мг.

**1.8. Выражение результатов исследования**

Отчет содержит, как минимум, информацию о наличии компонентов, происходящих от наземных животных и из рыбной муки. Различные случаи взаимоотносятся в порядке, описанном в подпунктах 1.8.1 и 1.8.2.

1.8.1. Что касается присутствия компонентов, происходящих от наземных животных:

1) насколько было заметно под микроскопом, в исследуемом образце не было выявлено компонентов, происходящих от наземных животных, или

2) насколько было видно под микроскопом, в исследуемом образце были обнаружены компоненты, происходящие от наземных животных.

1.8.2. Что касается присутствия в рыбной муке:

1) насколько было видно под микроскопом, ни один компонент, происходящий от рыбы, не был обнаружен в образце, или

2) насколько было видно под микроскопом, в исследуемом образце были обнаружены компоненты, происходящие от рыбы.

При обнаружении компонентов, происходящих от рыбы и наземных животных, отчет о результатах обследования, при необходимости, может указывать на оценку количества обнаруженных компонентов (х%, < 0,1%, от 0,1 до 0,5%, от 0,5 до 5% или > 5%), дополнительные характеристики о видах наземных животных, если это возможно, а также выявленные компоненты животного происхождения как мышцы, хрящ, кости, рога, волосы, щетина, перья, кровь, яичная скорлупа, рыбные кости, чешуя.

В случае, когда оценивается предполагаемое количество компонентов животного происхождения, указывается используемый коэффициент поправки “f”.

В случае, когда определены компоненты, полученные от наземных животных, отчет содержит дополнительное примечание: «Не исключена возможность происхождения вышеуказанных компонентов от млекопитающих».

Эта дополнительная информация не является необходимой, если костные частицы, происходящие от наземных животных, определяются, как костные частицы, происходящие от домашних птиц или от млекопитающих.

**1.9. Факультативный протокол для анализа жиров или масел**

Для анализа жиров или масел можно использовать следующий протокол:

1) Если жир твердый, он нагреваются, например, в микроволновой печи, пока не станет жидким.

2) С помощью пипетки перемещают 40 мл жира из нижней части образца в центрифугированную трубку.

3) Подвергается центрифугированию в течение 10 минут при 4000 оборотах в минуту.

4) Если жир становится твердым после центрифугирования, он нагревается снова в духовке, пока не станет жидким. Центрифугирование повторяется в течение пяти минут при 4000 оборотов в минуту.

5) С помощью маленькой ложки или шпателя переводят половину сцеживаемых примесей в чашку Петри или на микроскопическую пластинку для микроскопического определения возможного содержания компонентов животного происхождения, как например, волокна мяса, перья, костные частицы. Как включенное средство для микроскопии рекомендуются парафиновые масла или глицерин.

6) Оставшиеся примеси используются для осаждения, согласно описанию в подпункте 1.6.2.

7) Оставшиеся примеси используются для приготовления осаждения, согласно описанию в подпункте 1.6.1.

1.9.1 Использование агентов для окрашивания

Для облегчения правильного определения составляющих животного происхождения оператор может использовать агентов для окрашивания во время подготовки образцов в соответствии с направлениями, установленными референтной лабораторией Европейского союза для обнаружения животных белков в корме для животных, и опубликованными на ее официальной веб-странице.

В случае использования раствора красного ализарина для окрашивания осадков применяется следующий протокол:

1) сушеный осадок перемещают в стеклянный сосуд и дважды промывают 5 мл этанола, каждый раз используя шейкер в течение   
30 секунд, растворитель оставляют в течение одной минуты и 30 секунд и устраняют посредством литья;

2) осадок обесцвечивают, добавляя не менее 1 мл раствора гипохлорита натрия. Допускают, чтобы реакция продолжалась в течение 10 минут. Сосуд заполняют водой, ожидают 2-3 минуты, чтобы осадок отсеялся, а воду и частицы суспензии легко устраняют посредством литья;

3) осадок промывают еще два раза примерно с 10 мл воды. Используется шейкер в течение 30 секунд, а затем оставляют и далее исключают воду посредством литья каждый раз;

4) добавляют от двух до десяти капель раствора ализарина красного, смесь встряхивают. Разрешается провести реакцию в течение 30 секунд. Цветной осадок дважды промывают 5 мл этанола, затем один раз с ацетоном. Каждый раз используется шейкер в течение 30 секунд. Растворитель оставляют в течение одной минуты и устраняют посредством литья;

5) цветной осадок подготовлен для высушивания.

**1.10 Определение составляющих животного происхождения в корме полимеразы (PCR)**

Фрагменты дезоксирибонуклеиновой кислоты (в дальнейшем – ДНК) животного происхождения, которые могут присутствовать в сырье для кормов и комбикормов, обнаруживаются методом генетического усиления посредством PCR, которое относится к отрезкам ДНК, характерным для вида.

Метод PCR требует, в первую очередь, этапа экстракции ДНК. Этап усиления применяется после экстракции ДНК, полученного подобным образом, с целью обнаружения видов животных, предназначенных для тестирования.

1.10.1 Реагенты и оборудование, реагенты для этапа экстракции ДНК

Используются только реагенты, утвержденные референтной лабораторией Европейского союза, для обнаружения животных белков в корме для животных, и опубликованные на ее официальной веб-странице.

Используются только ранние плоды и зонды с отрезками олигонуклеотидов, утвержденных референтной лабораторией Европейского союза для обнаружения животных белков в корме для животных.

1.10.2 Используются только растворы основной смеси, которые не содержат реагенты, способные привести к ложным результатам в связи с наличием животного ДНК:

1) реагенты для обеззараживания;

2) раствор соляной кислоты – 0,1 N;

3) отбеливатель – раствор гипохлорита натрия 0,15 % активного хлора;

4) некоррозионные реагенты для обеззараживания дорогостоящих устройств, таких как аналитические весы, например, DNA EraseTM MP Biomedicals;

5) оборудование;

6) аналитические весы с точностью 0,001 г;

7) оборудование для измельчения;

8) амплификтор, позволяющий PCR в реальном времени;

9) микроцентрифуга для барабанов микроцентрифугирования;

10) набор микропипеток, позволяющих ввод пипеткой от 1 μl до 1000 μl;

11) стандартный пластический материал молекулярной биологии: барабаны микроцентрифугирования, фильтрированные пластиковые верхушки для микропипеток, пластинки для амплификатора;

12) морозилки для хранения образцов и реагентов.

1.10.3 Подготовка проб

Подготовка лабораторных проб до экстракции ДНК соблюдает требования, предусмотренные в приложении № 2 к настоящему пстановлению. Минимум 50 г пробы представляют подобразцы для анализа и последующего измельчения.

Подготовка проб осуществляется в помещении, отличном от помещений, предназначенных для экстракции ДНК и реагентов генетического усиления, описанных в ISO 24276.

Подготавливаются две тестируемые части минимум 100 мг каждая.

1.10.4 Экстракция ДНК

Экстракция ДНК осуществляется на каждой подготовленной тестируемой части с использованием процедур СОП, установленных референтной лабораторией Европейского союза для обнаружения животных белков в корме для животных, и опубликованных на ее официальной веб-странице. Подготавливаются для контроля экстракции для каждой серии экстракции, описанной в ISO 24276:

1) контрольная проверка экстракции;

2) проверка экстракции положительного ДНК.

Генетическое усиление осуществляется с использованием методов, утвержденных для каждого вида, требующего идентификации. Данные методы предусмотрены в процедурах СОП, установленных референтной лабораторией Европейского союза для обнаружения животных белков в корме для животных, и опубликованных на ее официальной веб-странице. Каждый экстракт ДНК анализируется минимум в двух различных растворителях с целью оценки подавления.

Подготавливаются два контроля усиления для каждого целевого вида, как они описаны в ISO 24276:

1) используется целевой контроль положительного ДНК для каждой пластинки или серии тестов PCR;

2) используется контроль реагента усиления, именуемого также контроль без образца, для каждой пластинки или серии тестов PCR.

1.10.5 Толкование и выражение результатов

Тогда, когда сообщает результаты, лаборатория указывает минимум вес использованной тестированной части, использованное средство для экстракции, количество проведенных определений и предел обнаружения метода.

Результаты не интерпретируются и не сообщаются, в случае если контроль экстракции положительного ДНК и целевые контроли положительного ДНК не предоставляют положительные результаты для цели, являющейся предметом теста, в то время, как контроль реагента усиления является отрицательным.

В случае если результаты двух тестируемых частей не являются последовательными, повторяется минимум этап генетического усиления. В случае если лаборатория подозревает, что экстракции ДНК не могут стать причиной непоследовательности, проводится новая экстракция ДНК и другое генетическое усиление до толкования результатов.

Итоговое выражение результатов основывается на интеграции и толковании результатов двух тестируемых частей в соответствии с процедурами СОП, установленными референтной лабораторией Европейского союза для обнаружения животных белков в корме для животных, и опубликованных на ее официальной веб-странице.

Отрицательный результат сообщается в случае, если ни одна ДНК от Х не была обнаружена в представленной пробе, где Х является видом животного или группой видов животных, предусмотренных тестом.

Положительный результат сообщается в случае, если была обнаружена ДНК от Х в представленной пробе, где Х является видом животного или группой видов животных, предусмотренных тестом.»