

Stofnaam	Diermeel
Type methode	Microscopische screeningsmethode
Te onderzoeken in	Diervoeders en diervoedergrondstoffen
Minimum bepaalbaarheids grens	0,1%
Herhaalbaarheid	
Reproduceerbaarheid	
Categorie	B
Titel	Richtlijn 2003/126/EG van de commissie van 23 december 2003 inzake de analysemethoden voor de bepaling van bestanddelen van dierlijke oorsprong in het kader van de officiële controle van diervoeders Bijlage: L339/80-84 van 24-12-2003

Voorschriften voor de microscopische detectie en identificatie van, en de schatting van het gehalte aan, bestanddelen van dierlijke oorsprong in diervoeders

1. Doel en toepassingsgebied

Deze voorschriften worden gebruikt voor het opsporen van bestanddelen van dierlijke oorsprong (gedefinieerd als producten verkregen door verwerking van karkassen en delen van karkassen van zoogdieren, pluimvee en vis) in diervoeders aan de hand van microscopisch onderzoek in het kader van het gecoördineerde inspectieprogramma op het gebied van diervoeding krachtens Richtlijn 95/53/EG. Op voorwaarde dat de methoden van deze bijlage voor alle officiële tests worden gebruikt, kan ook een tweede test worden uitgevoerd met afwijkende of alternatieve methoden, om de opsporing van bepaalde soorten dierlijke bestanddelen te verbeteren of de herkomst van de dierlijke bestanddelen nader te bepalen. Ook kan een afwijkend protocol worden gebruikt bij het onderzoek van bepaalde specifieke dierlijke bestanddelen zoals plasma of bot in talg (zie ook punt 9), mits die analyses worden uitgevoerd naast de in het gecoördineerde inspectieprogramma voorgeschreven analyses.

2. Gevoeligheid

Afhankelijk van de aard van de bestanddelen van dierlijke oorsprong kunnen zeer geringe hoeveelheden (minder dan 0,1 %) in diervoeders worden aangetoond.

3. Principe

Voor de identificatie wordt een representatief monster gebruikt, dat is genomen overeenkomstig Richtlijn 76/371/EEG van de Commissie van 1 maart 1976 houdende vaststelling van gemeenschappelijke bemonsteringsmethoden voor de officiële controle van diervoeders (1) en op adequate wijze is voorbereid. Het navolgende protocol is geschikt voor diervoeders met een laag vochtgehalte. Diervoeders met een hoger vochtgehalte dan 14 % worden vóór behandeling gedroogd (gecondenseerd). Voor bepaalde diervoeders of voedermiddelen (bv. vetten, oliën) is een speciale behandeling nodig (zie punt 9). De bestanddelen van dierlijke oorsprong worden geïdentificeerd op basis van typische microscopisch identificeerbare kenmerken (spierweefsel en andere vleesdeeltjes, kraakbeen, beenderen, hoorn, haar, bloed, veren, eierschalen, visgraten, schubben). Identificatie vindt plaats aan de hand van zowel de zeeffracties (punt 6.1) als het geconcentreerde sediment van het monster.

4. Reagentia

4.1. Inbedmedia

4.1.1. Chloraalhydraat (60 % in water, m/v)

4.1.2. Loog (NaOH 2,5 % m/v of KOH 2,5 % m/v) voor de zeeffracties

4.1.3. Paraffineolie of glycerol (viscositeit 68-81) voor microscopische waarneming in het sediment

4.2. Wasvloeistoffen

4.2.1. Alcohol, 96 %

4.2.2. Aceton

4.3. Sedimentatievloeistof

4.3.1. Tetrachloorethyleen (dichtheid 1,62)

4.4. Kleurstoffen

4.4.1. Jood-kaliumjodideoplossing (los 2 g kaliumjodide op in 100 ml water en voeg onder geregeld schudden 1 g jood toe)

4.4.2. Alizarinerood (verdun 2,5 ml zoutzuur 1 M in 100 ml water en voeg hieraan 200 mg alizarinerood toe)

4.4.3. Cystinereagens (2 g loodacetaat, 10 g NaOH/100 ml H₂O)

4.4.4 Jood-kaliumjodideoplossing (opgelost in 70 % ethanol)

4.5. Bleekmiddel

4.5.1. Natriumhypochlorietoplossing, in handelskwaliteit (9,6 % actief chloor)

5. Uitrusting

5.1. Analytische balans (nauwkeurigheid 0,01 g, voor het geconcentreerde sediment 0,001 g)

5.2. Verkleiningsapparatuur (maalmolen of vijzel, met name voor voeder dat bij de analyse meer dan 15 % vet bevat)

5.3. Zeefstel, voorzien van zeefgaas met vierkante mazen van maximaal 0,50 mm maaswijdte

5.4. Scheitrechter of imhoffglas

5.5. Stereomicroscoop (vergroting minimaal 40 ×)

5.6. Samengestelde microscoop (vergroting minimaal 400 ×), doorvallend licht of gepolariseerd licht

5.7. Gebruikelijk laboratoriumglaswerk

Alle uitrusting moet grondig gereinigd zijn. Scheitrecters en glaswerk moeten in een reinigingsmachine gereinigd worden. De zeven moeten met een hardharige borstel gereinigd worden.

6. Werkwijze

Voeder in pellets kan voorgezeefd worden als beide fracties afzonderlijk geanalyseerd worden.

Ga uit van ten minste 50 g monster (zo nodig na zorgvuldig malen met geschikte verkleiningsapparatuur (punt 5.2) om een juiste structuur te krijgen). Neem van het gemalen materiaal twee representatieve porties, een voor de zee fracties (minimaal 5 g) (punt 6.1) en een voor het geconcentreerde sediment (minimaal 5 g) (punt 6.2). Met het oog op de identificatie kan gebruikgemaakt worden van kleurstoffen (punt 6.3).

Om de aard van de dierlijke eiwitten en de herkomst van de deeltjes aan te geven kan gebruikgemaakt worden van een beslissingsondersteunend systeem zoals ARIES en van referentiemonsters.

6.1. Identificatie van de bestanddelen van dierlijke oorsprong in de zee fracties

Zeef ten minste 5 g van het monster met het zeefstel (punt 5.3) in twee fracties. De zee fractie(s) met de grove deeltjes (of een representatief deel daarvan) wordt/worden gebruikt als dunne laag op een geschikte drager en wordt/worden onder de stereomicroscop (punt 5.5) bij diverse vergrotingen onderzocht op bestanddelen van dierlijke oorsprong.

Met de zee fractie(s) met de fijne deeltjes worden preparaten gemaakt die onder de samengestelde microscoop (punt 5.6) bij diverse vergrotingen worden onderzocht op bestanddelen van dierlijke oorsprong.

6.2. Identificatie van de bestanddelen van dierlijke oorsprong in het geconcentreerde sediment

Breng ten minste 5 g monster (tot op 0,01 g nauwkeurig afgewogen) in een scheitrechter of imhoffglas en voeg ten minste 50 ml tetrachloorethyleen (punt 4.3.1) toe. Schud of roer het mengsel een aantal malen.

- Laat bij gebruik van een gesloten scheitrechter het mengsel enige tijd (ten minste drie minuten) staan en scheid vervolgens het sediment af. Herhaal het schudden en laat het sediment daarna ten minste drie minuten staan. Scheid het sediment nogmaals af.
- Laat bij gebruik van een open imhoffglas het mengsel ten minste vijf minuten staan en scheid vervolgens het sediment af.

Het volledige sediment wordt gedroogd en vervolgens gewogen (tot op 0,001 g nauwkeurig). Wegen is alleen nodig wanneer een schatting vereist is. Wanneer het sediment veel grove deeltjes bevat, kan het met een zeefstel (punt 5.3) in twee fracties worden verdeeld. Het droge sediment wordt onder de stereomicroscop (punt 5.5) en de samengestelde microscoop (punt 5.6) onderzocht op botbestanddelen.

6.3. Gebruik van inbedmedia en kleurstoffen

De microscopische identificatie van de bestanddelen van dierlijke oorsprong kan worden vergemakkelijkt door gebruik te maken van speciale inbedmedia en kleurstoffen.

Chloraalhydraat (punt 4.1.1): wanneer zorgvuldig wordt verhit, kunnen celstructuren duidelijker worden waargenomen omdat de zetmeelkorrels geleren en ongewenste celinhoud wordt verwijderd.

Loog (punt 4.1.2):	natriumhydroxide of kaliumhydroxide heldert het materiaal van het voeder op, waardoor het opsporen van spierweefsel, haar en andere keratinestructuren gemakkelijker wordt.
Paraffineolie en glycerol (punt 4.1.3)	botbestanddelen worden gemakkelijk geïdentificeerd in dit inbedmedium aangezien de meeste holten met lucht gevuld blijven en worden gezien als zwarte gaten van 5 à 15 µm.
Jood-kaliumjodideoplossing (punt 4.4.1):	wordt gebruikt voor het aantonen van zetmeel (blauwpaarse kleur) en eiwit (geeloranje kleur). De oplossingen kunnen zo nodig worden verdund.
Alizarineroodoplossing (punt 4.4.2):	rode/roze kleuring van beenderen, graten en schubben. Voordat het sediment wordt gedroogd (punt 6.2) wordt het volledige sediment overgebracht in een glazen reageerbuis en tweemaal met ongeveer 5 ml alcohol (punt 4.2.1) gespoeld (beide keren vortexen, ongeveer een minuut laten bezinken en het oplosmiddel afschenken). Vóór gebruik van de kleurstof wordt het sediment gebleekt door toevoeging van ten minste 1 ml natriumhypochlorietoplossing (punt 4.5.1). Laat gedurende tien minuten reageren. Vul de reageerbuis met water, laat het sediment twee à drie minuten bezinken en schenk het water en de gesuspendeerde deeltjes af. Spoel het sediment vervolgens tweemaal met ongeveer 10 ml water (beide keren vortexen, laten bezinken en het water afschenken). Voeg twee tot tien druppels alizarineroodoplossing toe, afhankelijk van de hoeveelheid residu. Schud het mengsel en laat enkele seconden reageren. Spoel het gekleurde sediment vervolgens tweemaal met ongeveer 5 ml alcohol (punt 4.2.1) en daarna eenmaal met aceton (punt 4.2.2) (telkens vortexen, ongeveer een minuut laten bezinken en het oplosmiddel afschenken). Hierna kan het sediment worden gedroogd.
Cystinereagens (punt 4.4.3):	wanneer zorgvuldig wordt verhit, worden de cystine-bevattende bestanddelen (haar, veren, enz.) zwartbruin.

6.4. *Onderzoek van diervoeders die vismeel kunnen bevatten*

Ten minste één preparaat van de fijne zeeffractie en van de fijne fractie van het sediment wordt onder de samengestelde microscoop onderzocht (punten 6.1 en 6.2).

Wanneer vismeel volgens het etiket een van de ingrediënten is of in het eerste onderzoek wordt vermoed of geconstateerd dat vismeel aanwezig is, worden ten minste nog twee preparaten van de fijne zeeffractie van het oorspronkelijke monster alsmede de volledige sedimentfractie onderzocht.

7. Berekening en evaluatie

De lidstaten zorgen ervoor dat de in dit punt beschreven procedures worden gevolgd wanneer een officiële analyse wordt uitgevoerd met het oog op de schatting van het gehalte aan (en niet slechts de aanwezigheid van) dierlijke bestanddelen.

De berekening kan alleen worden gemaakt indien de bestanddelen van dierlijke oorsprong botfragmenten bevatten.

Botfragmenten van warmbloedige landdieren (d.w.z. zoogdieren en vogels) kunnen van de verschillende soorten visgraten in het microscopisch preparaat worden onderscheiden aan de hand van de typische lacunen. Het gehalte aan bestanddelen van dierlijke oorsprong in het monster wordt geschat met inachtneming van:

- het geschatte aandeel (gewichtsperscentage) botfragmenten in het geconcentreerde sediment en
- het aandeel (gewichtsperscentage) bot in de bestanddelen van dierlijke oorsprong.

De schatting moet gebaseerd zijn op ten minste drie preparaten (indien mogelijk) en ten minste vijf velden per preparaat. Bij mengvoeders bevat het geconcentreerde sediment normaliter niet alleen botfragmenten van landdieren en visgraatfragmenten, maar ook andere deeltjes met een hoog soortelijk gewicht, bijvoorbeeld mineralen, zand, verhoude plantendeeltjes en dergelijke.

7.1. Geschatte waarde van het percentage botfragmenten

% botfragmenten van landdieren = $(S \times c)/W$

% fragmenten van visgraten en schubben = $(S \times d)/W$

(S = gewicht van het sediment (mg), c = correctiefactor (%) voor het geschatte aandeel botbestanddelen van landdieren in het sediment, d = correctiefactor (%) voor het geschatte aandeel fragmenten van visgraten en schubben in het sediment, W = gewicht van het voor de sedimentatie gebruikte monstermateriaal (mg)).

7.2. Geschatte waarde van de bestanddelen van dierlijke oorsprong

Het aandeel bot in dierlijke producten kan aanzienlijk variëren. (Het percentage bot in beendermeel ligt in de orde van 50-60 %, in vleesmeel in de orde van 20-30 %; in vismeel varieert het gehalte aan graten en schubben naar gelang van de soort en de oorsprong van het vismeel, maar normaal ligt het in de orde van 10-20 %).

Indien de aard van het in het monster aanwezige diermeel bekend is, kan het gehalte worden geschat:

Geschat gehalte aan bestanddelen afkomstig van landdieren (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Geschat gehalte aan bestanddelen afkomstig van vis (%) = $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

(S = gewicht van het sediment (mg), c = correctiefactor (%) voor het geschatte aandeel botbestanddelen van landdieren in het sediment, d = correctiefactor (%) voor het geschatte aandeel fragmenten van visgraten en schubben in het sediment, f = correctiefactor voor het aandeel bot in de bestanddelen van dierlijke oorsprong in het onderzochte monster, W = gewicht van het voor de sedimentatie gebruikte monstermateriaal (mg)).

8. Weergave van het resultaat van het onderzoek

Er moet ten minste informatie worden verstrekt over de aanwezigheid van bestanddelen afkomstig van landdieren en van vismeel. De verschillende gevallen worden als volgt gerapporteerd:

8.1. Wat betreft de aanwezigheid van bestanddelen afkomstig van landdieren:

- voorzover microscopisch kan worden waargenomen, bevat het onderzochte monster geen bestanddelen afkomstig van landdieren, of:
- voorzover microscopisch kan worden waargenomen, bevat het onderzochte monster bestanddelen afkomstig van landdieren.

8.2. Wat betreft de aanwezigheid van vismeel:

- voorzover microscopisch kan worden waargenomen, bevat het onderzochte monster geen bestanddelen afkomstig van vissen, of:
- voorzover microscopisch kan worden waargenomen, bevat het onderzochte monster bestanddelen afkomstig van vissen.

Wanneer bestanddelen afkomstig van vissen of landdieren worden aangetroffen, kan bij de uitslag van het onderzoek zo nodig ook een schatting worden gegeven van de hoeveelheid aangetroffen bestanddelen (x %, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % of > 5 %) en kunnen het soort landdier, zo mogelijk, en de geïdentificeerde dierlijke bestanddelen (spierweefsel, kraakbeen, beenderen, hoorn, haar, bloed, veren, eierschalen, visgraten, schubben) worden vermeld.

Ingeval een schatting van de hoeveelheid dierlijke ingrediënten wordt gegeven, moet de gehanteerde correctiefactor f worden vermeld.

Indien botbestanddelen van landdieren worden geïdentificeerd, bevat het rapport bovendien de volgende zin:

“De mogelijkheid dat de bovengenoemde bestanddelen afkomstig zijn van zoogdieren kan niet worden uitgesloten.”.

Deze zin is niet vereist indien voor de botfragmenten van landdieren is aangegeven of zij van pluimvee of van zoogdieren afkomstig zijn.

9. Facultatief protocol voor de analyse van vetten en oliën

Het volgende protocol kan voor de analyse van vetten en oliën worden gebruikt:

- Verwarm vast vet, bijvoorbeeld in een microgolfoven, tot het gesmolten is.
- Pipetteer 40 ml vet van het onderste gedeelte van het monster in een centrifugebuis.
- Centrifugeer gedurende tien minuten bij 4 000 omwentelingen per minuut.
- Als het vet na het centrifugeren gestold is, verwarm het dan nogmaals in een oven tot het gesmolten is.
- Centrifugeer nogmaals gedurende vijf minuten bij 4 000 omwentelingen per minuut.
- Breng de helft van de gedecanteerde onzuiverheden met een lepel of spatel over in een petrischaaltje of op een objectglaasje voor microscopische identificatie van eventuele dierlijke bestanddelen (vleesdeeltjes, veren, botfragmenten, enz.). Als inbedmedium voor microscopie wordt paraffineolie of glycerol aanbevolen.
- De resterende onzuiverheden worden gebruikt voor sedimentatie zoals beschreven in punt 6.2.