

DIRETTIVA 2003/126/CE DELLA COMMISSIONE
del 23 dicembre 2003

che stabilisce il metodo analitico 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 DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 70/373/CEE del Consiglio, del 20 luglio 1970, relativa all'introduzione di modi di prelievo di campioni e di metodi di analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 2,

considerando quanto segue:

- (1) La direttiva 70/373/CEE stabilisce che i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali destinati ad accertare l'osservanza dei requisiti previsti da disposizioni legislative, regolamentari o amministrative in materia di qualità e composizione di tali alimenti, devono essere effettuati secondo metodi di prelievo e di campioni e metodi di analisi comunitari.
- (2) Le norme relative all'etichettatura degli alimenti per animali e proibizione dell'uso di taluni tipi di proteine animali nell'alimentazione per animali per alcune categorie di animali implica la necessità di fornire metodi analitici affidabili per stabilire la loro presenza e, se necessario, la loro percentuale.
- (3) Il metodo descritto nell'allegato della direttiva della Commissione 98/88/CE del 13 novembre 1998 che stabilisce gli orientamenti per l'identificazione al microscopio e la stima dei costituenti di origine animale nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti per animali ⁽²⁾ costituisce oggi l'unico metodo valido di controllo della presenza di proteine animali, comprese quelle trattate a 133 °C/3Bar/20', negli alimenti per animali.
- (4) Uno studio comparativo per determinazione delle proteine di origine animale recentemente ha dimostrato che la variazione nell'applicazione dei test microscopici fissati nella direttiva 98/88/CE avrebbe come risultato differenze significative nella sensibilità, specificità e accuratezza del metodo. Allo scopo di armonizzare e migliorare la determinazione delle proteine di origine animale, le norme relative al metodo al microscopio dovrebbero essere ulteriormente specificate e rese obbligatorie. È necessario assicurare che gli analisti che effettuano tali prove siano formati in modo adeguato dal momento che il risultato dipende dalla capacità dell'analista.
- (5) La direttiva 98/88/CE dovrebbe quindi essere sostituita.
- (6) Le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali,

Articolo 1

Gli Stati membri provvedono affinché gli esami ufficiali effettuati nell'ambito di controlli ufficiali volti ad identificare e/o a fornire una stima quantitativa dei costituenti di origine animale negli alimenti per animali si svolgano in conformità degli orientamenti esposti nell'allegato della presente direttiva nell'ambito del programma di controllo coordinato nel settore degli alimenti per animali, in conformità con la direttiva 95/53/CE del Consiglio ⁽³⁾.

Articolo 2

Gli Stati membri provvedono affinché i laboratori che effettuano i controlli ufficiali sulla presenza di costituenti di origine animale negli alimenti per animali partecipino periodicamente a prove valutative dei metodi analitici e che il personale del laboratorio che effettua le analisi riceva una formazione adeguata.

Articolo 3

La direttiva 98/88/CE è abrogata.

I riferimenti alla direttiva abrogata sono considerati riferimenti a questa direttiva.

Articolo 4

1. Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva entro il 1° luglio 2004. Essi comunicano immediatamente alla Commissione il testo di tali disposizioni nonché una tavola di concordanza tra queste ultime e la presente direttiva.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste devono contenere un riferimento alla presente direttiva od essere corredate di siffatto riferimento all'anno della pubblicazione ufficiale. Le modalità del riferimento sono decise dagli Stati membri.

2. Gli Stati membri trasmettono alla Commissione il testo delle disposizioni essenziali di diritto interno che essi adottano nel settore disciplinato della presente direttiva.

⁽¹⁾ GU L 170 del 3.8.1970, pag. 2 direttiva modificata da ultimo dal regolamento (CE) n. 807/2003 (GU L 122 del 16.5.2003, pag. 36).

⁽²⁾ GU L 318 del 27.11.1998, pag. 45.

⁽³⁾ GU L 265 del 5.11.1995, pag. 17. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 2001/46/CE (GU L 234 dell'1.9.2001, pag. 55).

Articolo 5

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

Articolo 6

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 23 dicembre 2003.

Per la Commissione
David BYRNE
Membro della Commissione

ALLEGATO

Condizioni per l'identificazione al microscopio, la determinazione o la stima dei costituenti di origine animale negli alimenti per animali**1. Obiettivo e campo di applicazione**

I presenti orientamenti devono essere applicati per l'identificazione, mediante esame microscopico, dei costituenti di origine animale (definiti come i prodotti della trasformazione di carcasse e parti di carcasse di mammiferi, pollame e pesci) presenti negli alimenti per animali nell'ambito del programma di controllo coordinato nel settore degli alimenti per animali in conformità con la direttiva 95/53/CE del Consiglio. Se i metodi indicati in questo allegato sono utilizzati in tutte le analisi ufficiali, una seconda analisi può essere effettuata con metodi diversi o alternativi, per migliorare l'identificazione di taluni tipi di costituenti di origine animale o per specificarne l'origine. Inoltre, altri metodi possono essere utilizzati per esaminare alcuni tipi di costituenti animali come ad esempio il plasma o le ossa con sevo (cfr. anche il punto 9), sempre che tali analisi siano effettuate oltre a quelle previste dal programma di controllo coordinato.

2. Sensibilità

In funzione della natura dei costituenti di origine animale, è possibile individuare negli alimenti per animali quantità molto piccole (< 0,1 %).

3. Principio

Un campione rappresentativo, prelevato secondo le norme fissate dalla direttiva 76/371/CEE della Commissione del 1° marzo 1976, che fissa i modi comunitari di prelevamento dei campioni per il controllo ufficiale degli alimenti per animali ⁽¹⁾ che sia stato preparato in modo adatto, è utilizzato per l'identificazione. Il seguente protocollo è valido per il trattamento di alimenti a basso tenore di umidità. Gli alimenti con un tenore di umidità superiore al 14 % saranno essiccati (condensati) prima del trattamento. Alimenti o materiali speciali (ad esempio grassi, oli) necessitano di un trattamento particolare (cfr. punto 9). I costituenti di origine animale sono identificati sulla base di caratteristiche tipiche, identificabili al microscopio (ad esempio fibre muscolari o altre particelle di carne, cartilagine, ossa, corna, peli, setole, sangue, piume, gusci d'uovo lische, scaglie). L'identificazione va fatta sia sulla frazione granulometrica (6.1) sia sul sedimento concentrato (6.2) del campione.

4. Reagenti**4.1. Agenti di rivestimento**

4.1.1. Cloralio idrato (acquoso, 60 % w/v)

4.1.2. Liscivia (NaOH 2,5 % w/v o KOH 2,5 % w/v) per le frazioni granulometriche

4.1.3. Olio di paraffina o glicerolo (viscosità: 68-81) per le osservazioni al microscopio del sedimento

4.2. Agenti di risciacquo

4.2.1. Alcool al 96 %

4.2.2. Acetone

4.3. Agenti concentratori

4.3.1. Tetracloroetilene (densità 1,62)

4.4. Reagenti di mordenzatura

4.4.1. Iodio/soluzione di ioduro di potassio (dissolvere 2 g di ioduro di potassio in 100 ml di acqua e aggiungere 1 g di iodio e agitare spesso)

4.4.2. Rosso alizarina (diluire 2,5 ml di acido idroclorico 1M in 100 ml di acqua, aggiungere 200 mg di rosso alizarina alla soluzione)

4.4.3. Reagente cisteina (2 g di acetato di piombo, 10 g di NaOH/100 ml H₂O)

4.4.4. Iodio/soluzione di ioduro di potassio (soluzione in 70 % di etanolo)

(¹) GU L 102 del 15.4.1976, pag. 1.

4.5. *Reagente sbiancante*

4.5.1. Soluzione commerciale di ipoclorito di sodio (9,6 % cloruro attivo)

5. **Attrezzatura e accessori**

5.1. Bilancia analitica (precisione a 0,01 g ad eccezione del sedimento concentrato: 0,001 g)

5.2. Materiale per frantumazione (frantumatore o mortaio speciale per mangimi contenenti > 15 % di grasso all'analisi).

5.3. Setaccio a maglie quadrate di 0,50 mm massimo

5.4. Becco separatore o coppa di decantazione a fondo conico

5.5. Stereomicroscopio (minimo 40 ingrandimenti)

5.6. Microscopio composto (minimo 400 ingrandimenti), in trasparenza o a luce polarizzata

5.7. Normale vetrerie da laboratorio

Tutti gli attrezzi devono essere perfettamente puliti. I beccchi separatori e la vetreria devono essere lavati in lavapiatti. I setacci vanno puliti usando una spazzola a setole rigide.

6. **Procedimento**

Il mangime granulare può essere setacciato se entrambe le parti sono analizzate come campione separato.

Almeno 50 g del campione deve essere trattato [macinato con cura usando gli strumenti adatti per ottenere la struttura desiderata (5.2)]. Dal materiale trattato si prendano due parti rappresentative, una per la frazione granulometrica (almeno 5 g) (6.1) e una per il sedimento concentrato (almeno 5 g) (6.2). La colorazione mediante coloranti (6.3) può essere utilizzata per identificazione.

Allo scopo di indicare la natura delle proteine animali e l'origine delle particelle si può usare un sistema di sostegno come ARIES e i campioni di riferimento possono essere documentati.

6.1. *Identificazione di costituenti di origine animale nelle frazioni granulometriche*

Setacciare almeno 5 g del campione attraverso il setaccio (5.3) in due frazioni

La frazione(i) granulometrica a particelle grandi (o una parte rappresentativa della frazione) è versata in sottile strato su un supporto adatto e analizzata sistematicamente con lo stereomicroscopio (5.5) a vari ingrandimenti per identificare i costituenti di origine animale.

Vetrini con la frazione granulometrica(e) delle particelle più sottili sono analizzate sistematicamente al microscopio composto (5.6) a vari ingrandimenti per identificare i costituenti di origine animale.

6.2. *Identificazione di costituenti di origine animale nel sedimento concentrato*

Almeno 5 g (accuratezza fino allo 0,01 g) del campione saranno trasferiti in un becco separatore o in una coppa di decantazione a fondo conico e trattati con almeno 50 ml di tetracloroetilene (4.3.1). Il miscuglio va agitato o mescolato ripetutamente.

— Se si usa un becco separatore chiuso il sedimento va lasciato riposare per una durata sufficiente (almeno 3 minuti) prima che il sedimento si separi. Agitare di nuovo e lasciare il sedimento riposare di nuovo per almeno 3 minuti. Il sedimento si separa di nuovo.

— Se si usa una coppa aperta, il sedimento deve riposare per almeno 5 minuti prima che si separi.

Il sedimento totale viene fatto asciugare e conseguentemente pesato (accuratezza fino allo 0,001 g). La pesatura è necessaria unicamente nel caso in cui sia richiesta una stima. Se il sedimento è composto da diverse particelle più grandi può essere setacciato in due frazioni (5.3). Il sedimento secco va esaminato per individuare costituenti a base di ossa allo stereomicroscopio (5.5) e al microscopio composto (5.6).

6.3. Utilizzo di agenti di rivestimento e di reagenti di mordenzatura

L'identificazione al microscopio di costituenti di origine animale può essere aiutata con l'uso di agenti speciali di rivestimento o reagenti di mordenzatura.

Cloralio idrato (4.1.1):	scaldando con attenzione, le strutture cellulari sono visibili più chiaramente in quanto i grani di amido si gelatinizzano e i contenuti cellulari individuati sono rimossi.
Liscivia (4.1.2):	sia l'idrossido di sodio che l'idrossido di potassio chiarificano il materiale del mangime, aiutando l'individuazione di fibre muscolari, peli o altre strutture a base di cheratina.
Olio di paraffina o glicerolo (4.1.3):	i costituenti a base di osso possono essere ben identificati con questo agente in quanto la maggior parte delle lacune rimangono riempite con aria e appaiono quindi come buchi neri di circa 5-15 µm.
Iodio/soluzione di ioduro di potassio (4.4.1):	utilizzato per il reperimento dell'amido (colore blu-violetto) e delle proteine (colore giallo-arancio). Le soluzioni possono essere diluite se necessario.
Soluzione di rosso alizarina (4.4.2):	colorazione rosso/rosa di ossa, lische e scaglie. Prima di asciugare il sedimento (cfr. sezione 6.2), il sedimento totale va trasferito in un tubo di vetro e risciacquato due volte con circa 5 ml di alcool (4.2.1) (ogni volta che si utilizza un miscelatore, il solvente va lasciato riposare per un minuto e poi versato fuori). Prima di utilizzare il reagente di mordenzatura il sedimento va sbiancato aggiungendo almeno 1 ml di soluzione di ipoclorito di sodio (4.5.1). La reazione deve agire per almeno 10 minuti. Il tubo va riempito con acqua, il sedimento si lascia riposare per 2-3 minuti e l'acqua e le particelle in sospensione vanno versate via. Il sedimento va risciacquato ancora due volte con circa 10 ml di acqua (usare un miscelatore, lasciare riposare e versare l'acqua ogni volta). Da due a dieci o più gocce (secondo la quantità di residuo) della soluzione rosso alizarina vanno aggiunte. La mescolanza va agitata e la reazione va lasciata operare per alcuni secondi. Il sedimento colorato va risciacquato due volte con circa 5 ml di alcool (4.2.1) e poi con una risciacquatura di acetone (4.2.2) (ogni volta che si usa un miscelatore il solvente va lasciato riposare per circa un minuto e versato fuori). Il sedimento è ora pronto per essere essiccato.
Reagente cisteina: (4.4.3)	con un accurato riscaldamento i costituenti che contengono cisteina (peli, piume, etc.) diventano neri/marrone.

6.4. Analisi di mangimi che possono contenere farina di pesce

Almeno un vetrino dalla frazione setacciata fine e dalla frazione di sedimento fine va esaminato al microscopio composto (cfr. sezioni 6.1 e 6.2).

Dove l'etichetta indica che gli ingredienti includono la farina di pesce o se la presenza di farina di pesce è sospettata o individuata nel corso di un primo esame, almeno altri due vetrini della sezione setacciata fine del campione originale ed il totale della frazione del sedimento vanno esaminati.

7. Calcolo e valutazione

Gli Stati membri assicurano che le procedure descritte in questo punto siano utilizzate quando viene effettuata un'analisi ufficiale allo scopo di stimare il contenuto (e non solo la presenza) di costituenti di origine animale.

Il calcolo può essere effettuato solo se i costituenti di origine animale contengono frammenti ossei.

Nei preparati al microscopio si possono distinguere frammenti di ossa delle specie terrestri a sangue caldo (ad es. mammiferi ed uccelli) dai diversi tipi di ossa di pesce grazie alle tipiche lacune. La proporzione di costituenti di origine animale nel campione di materiale è valutata prendendo in considerazione:

- la percentuale stimata (peso %) di frammenti ossei nel sedimento concentrato, e
- la proporzione di osso (peso %) nei costituenti di origine animale.

La stima deve essere basata su almeno tre (se possibile) preparati e almeno cinque campi per preparato. Nelle miscele di alimenti il sedimento concentrato contiene generalmente non solo frammenti di ossa di animali terrestri e di lische di pesce, ma anche altre particelle dal peso specifico elevato, come ad esempio minerali, sabbia, frammenti di minerali lignificati, etc.

7.1. Stima della percentuale di frammenti ossei

$$\% \text{ di frammenti ossei di animali terrestri} = (S \times c)/W$$

$$\% \text{ di frammenti di lische e scaglie} = (S \times d)/W$$

[S = peso del sedimento (mg), c = fattore di correzione (%) per la porzione stimata di ossa di animali terrestri nel sedimento, d = fattore di correzione (%) per la porzione stimata di frammenti di ossa e scaglie di pesce nel sedimento, W = peso del campione di materiale utilizzato per la sedimentazione (mg)].

7.2. Stima dei costituenti di origine animale

La proporzione di osso nei prodotti di origine animale può variare in modo notevole. (La percentuale di osso nel caso di farina d'ossa è del 50-60 % e nel caso di farina di carne è dell'ordine del 20-30 %; nelle farine di pesce il tenore di ossa e di scaglie varia in funzione della categoria e dell'origine della farina di pesce, ma è normalmente compreso tra il 10-20 %).

Se si conosce il tipo di farina animale contenuta nel campione, è possibile effettuare delle stime:

$$\text{Contenuto stimato dei costituenti di prodotti a base di animali terrestri (\%)} = (S \times c)/(W \times f) \times 100$$

$$\text{Contenuto stimato di costituenti di prodotti a base di pesce (\%)} = (S \times d)/(W \times f) \times 100$$

[S = peso del sedimento (mg), c = fattore di correzione (%) per la porzione stimata di ossa di animali terrestri nel sedimento, d = fattore di correzione (%) per la porzione stimata di frammenti di ossa e scaglie di pesce nel sedimento, f = fattore di correzione per la proporzione di ossa nei costituenti di origine animale presenti nel campione esaminato, W = peso del campione di materiale utilizzato per la sedimentazione (mg)].

8. Presentazione dei risultati dell'esame

La relazione deve almeno contenere informazioni sulla presenza di costituenti derivati da animali terrestri e da farina di pesce. I diversi casi potrebbero essere presentati nella maniera seguente:

8.1. Per quanto riguarda la presenza di costituenti derivati da animali terrestri:

— secondo l'esame al microscopio, non sono stati trovati costituenti derivati da animali terrestri nel campione esaminato.

Oppure:

— secondo l'esame al microscopio, sono stati trovati costituenti derivati da animali terrestri nel campione esaminato

8.2. e, per quanto riguarda la presenza di farina di pesce:

— secondo l'esame al microscopio non sono stati trovati costituenti derivati di pesce nel campione esaminato.

Oppure:

— secondo l'esame al microscopio sono stati trovati costituenti derivati di pesce nel campione esaminato.

Nel caso in cui siano ritrovati costituenti derivati da pesce o da animali terrestri, la relazione dei risultati può, se necessario indicare una stima della quantità di costituenti individuati (x %, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % o > 5 %), e ulteriori indicazioni del tipo di animali terrestri se è possibile e dei costituenti di origine animale identificati (fibre muscolari, cartilagini, ossa, corna, peli, setole, piume, sangue, gusci d'uovo, scaglie e lische).

Nel caso in cui la quantità d'ingredienti di origine animale sia stimato va citato il fattore di correzione f.

Per i casi in cui i costituenti di ossa da animali terrestri sono identificati, la relazione deve contenere la frase addizionale:

«Non si può escludere la possibilità che i costituenti sopra descritti provengano da mammiferi.»

La clausola addizionale non è necessaria qualora sia stato determinato se i frammenti ossei di animali terrestri provengano da pollame o da mammiferi.

9. **Protocollo facoltativo per l'analisi di grasso o olio**

Il seguente protocollo può essere utilizzato per l'analisi di grasso o olio:

- Se il grasso è solido, si scalda ad esempio in un forno a micro onde fino a che non diventi liquido.
 - Con un contagocce trasferire 40 ml di grasso dalla base del campione ad un tubo di centrifugazione.
 - Centrifugate per 10 minuti a 4 000 giri al minuto.
 - Se il grasso è solido dopo la centrifugazione, scaldarlo nuovamente nel forno finché non ridiventa liquido. Ripetere la centrifugazione per 5 minuti a 4 000 giri al minuto.
 - Con un cucchiaino o una spatola trasferire una metà delle impurità decantate in una piccola scatola di Petri o un vetrino microscopico per l'identificazione al microscopio di un possibile contenuto di costituenti di origine animale (fibre di carne, piume, frammenti d'osso, ...). Si raccomanda l'uso di un agente di rivestimento come l'olio di paraffina o il glicerolo.
 - Le restanti impurità sono utilizzate per sedimentazione come descritto al punto 6.2.
-