

REGLAMENTO (UE) N° 51/2013 DE LA COMISIÓN**de 16 de enero de 2013****por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 152/2009 en lo que respecta a los métodos de análisis para la determinación de componentes de origen animal con fines de control oficial de los piensos****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) n° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 11, apartado 4,

Considerando lo siguiente:

- (1) El artículo 7, apartado 1, del Reglamento (CE) n° 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2001, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) ⁽²⁾, prohíbe utilizar proteínas procedentes de animales en la alimentación de rumiantes. Esta prohibición se amplía a los animales distintos de los rumiantes y está limitada, en lo relativo a la alimentación de dichos animales con productos de origen animal, de conformidad con lo dispuesto en el anexo IV de dicho Reglamento.
- (2) El artículo 11, apartado 1, del Reglamento (CE) n° 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) n° 1774/2002 ⁽³⁾, prohíbe la alimentación de animales terrestres de una especie determinada distintos de animales de peletería con proteínas animales procesadas derivadas de cuerpos o partes de animales de su misma especie, así como la alimentación de peces de piscifactoría con proteínas animales procesadas derivadas de cuerpos o partes de peces de piscifactoría de la misma especie.
- (3) El Reglamento (CE) n° 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los

piensos ⁽⁴⁾, establece en su anexo VI los métodos de análisis para la determinación de componentes de origen animal con fines de control oficial de los piensos. Gracias al método de examen microscópico, que es actualmente el único método validado para detectar la presencia de proteínas animales en los piensos, se puede distinguir la presencia de componentes derivados de animales terrestres de la presencia de componentes derivados del pescado, pero no se puede cuantificar con un grado suficiente de precisión la cantidad de componentes de origen animal presentes en los piensos y, por tanto, dicho método no debe utilizarse con ese fin.

- (4) El laboratorio de referencia de la UE para las proteínas animales en los piensos ha validado un nuevo método de detección de componentes de origen animal basado en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Un estudio de aplicación, organizado conjuntamente con los laboratorios nacionales de referencia de los Estados miembros, ha demostrado que el nuevo método es lo suficientemente sólido para utilizarse como método de control oficial en la Unión. Este nuevo método permite detectar la presencia de componentes de origen animal en los piensos, y también permite identificar las especies de origen de dichos componentes. La utilización de este nuevo método en combinación con el método de examen microscópico o en lugar de este, según proceda, sería muy valiosa para el control de la correcta aplicación de las prohibiciones en materia de alimentación de los animales establecidas en los Reglamentos (CE) n° 999/2001 y (CE) n° 1069/2009.
- (5) Procede, por tanto, sustituir el anexo VI del Reglamento (CE) n° 152/2009 en consecuencia.
- (6) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal y ni el Parlamento Europeo ni el Consejo se han opuesto a ellas.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo VI del Reglamento (CE) n° 152/2009 se sustituye por el texto que figura en el anexo del presente Reglamento.

⁽¹⁾ DO L 165 de 30.4.2004, p. 1.

⁽²⁾ DO L 147 de 31.5.2001, p. 1.

⁽³⁾ DO L 300 de 14.11.2009, p. 1.

⁽⁴⁾ DO L 54 de 26.2.2009, p. 1.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 16 de enero de 2013.

Por la Comisión
El Presidente
José Manuel BARROSO

ANEXO

«ANEXO VI

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPONENTES DE ORIGEN ANIMAL CON FINES DE CONTROL OFICIAL DE LOS PIENSOS

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Los componentes de origen animal presentes en los piensos se determinarán por microscopía óptica o por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de conformidad con las disposiciones establecidas en el presente anexo.

Estos dos métodos permiten detectar la presencia de componentes de origen animal en los materiales para piensos y los piensos compuestos. Sin embargo, no permiten calcular la cantidad de dichos componentes en los materiales para piensos ni en los piensos compuestos. Ambos métodos presentan un límite de detección inferior al 0,1 % (p/p).

El método RCP permite identificar los grupos taxonómicos de los componentes de origen animal presentes en los materiales para piensos y los piensos compuestos.

Estos métodos se aplicarán al control de la aplicación de las prohibiciones establecidas en el artículo 7, apartado 1, y en el anexo IV del Reglamento (CE) n° 999/2001, así como en el artículo 11, apartado 1, del Reglamento (CE) n° 1069/2009.

Dependiendo del tipo de piensos que se esté analizando, podrán aplicarse estos métodos, dentro de un único protocolo de actuación, ya sea solos o combinados de conformidad con los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) establecidos por el laboratorio de referencia de la UE para las proteínas animales en los piensos (EURL-AP) y publicados en su sitio web ⁽¹⁾.

2. MÉTODOS

2.1. **Microscopía óptica**2.1.1. *Principio*

Los componentes de origen animal que pudieran estar presentes en los materiales para piensos y en los piensos compuestos enviados para su análisis se identifican sobre la base de unas características típicas microscópicamente identificables, como fibras musculares y otras partículas de carne, cartílago, huesos, cuerno, pelo, cerdas, sangre, plumas, cáscaras de huevo, espinas y escamas de pescado.

2.1.2. *Reactivos y equipo*

2.1.2.1. Reactivos

2.1.2.1.1. Agente de concentración

2.1.2.1.1.1. Tetracloroetileno (densidad relativa 1,62).

2.1.2.1.2. Reactivo de tinción

2.1.2.1.2.1. Solución de rojo de alizarina (diluir 2,5 ml de ácido clorhídrico 1M en 100 ml de agua y añadir a esta solución 200 mg de rojo de alizarina).

2.1.2.1.3. Medios de montaje

2.1.2.1.3.1. Lejía (NaOH al 2,5 % p/v o KOH al 2,5 % p/v).

2.1.2.1.3.2. Glicerol (sin diluir, viscosidad: 1 490 cP).

2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical 65 Adhesive (viscosidad: 1 200 cP) o una resina con propiedades equivalentes para la preparación permanente de los portaobjetos.

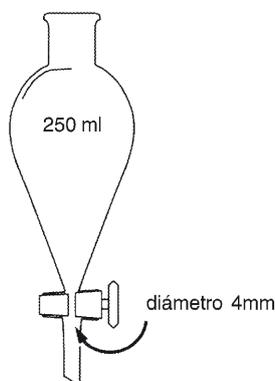
2.1.2.1.4. Medios de montaje con propiedades de tinción

2.1.2.1.4.1. Solución de Lugol (disolver 2 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua y añadir 1 g de yodo, agitando con frecuencia).

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2. Reactivo de cistina (2 g de acetato de plomo, 10 g de NaOH/100 ml de agua).
- 2.1.2.1.4.3. Reactivo de Fehling [preparado antes de utilizarse a partir de partes iguales (1/1) de dos soluciones madre A y B; solución A: disolver 6,9 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado en 100 ml de agua; solución B: disolver 34,6 g de tartrato sódico-potásico tetrahidratado y 12 g de NaOH en 100 ml de agua].
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno [disolver 1 g 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en 100 ml de ácido acético glacial y 150 ml de agua; antes de utilizarlo, mezclar 4 partes de esta solución de TMB con 1 parte de peróxido de hidrógeno al 3 %].
- 2.1.2.1.5. Agentes de lavado
- 2.1.2.1.5.1. Etanol \geq 96 % (calidad técnica).
- 2.1.2.1.5.2. Acetona (calidad técnica).
- 2.1.2.1.6. Reactivo decolorante
- 2.1.2.1.6.1. Solución comercial de hipoclorito de sodio (9 - 14 % de cloro activo).
- 2.1.2.2. Equipo
- 2.1.2.2.1. Balanza analítica con una exactitud de 0,001 g.
- 2.1.2.2.2. Material de trituración: molino o mortero.
- 2.1.2.2.3. Un tamiz con luces de malla cuadradas de 0,25 mm y 1 mm de anchura.
- 2.1.2.2.4. Embudo de decantación cónico de vidrio con un contenido de 250 ml provisto de un grifo de cierre de teflón o esmerilada en la base del cono. El diámetro del orificio del grifo será \geq 4 mm. De forma alternativa, podrá utilizarse un vaso de precipitados de fondo cónico siempre que el laboratorio haya demostrado que los niveles de detección son equivalentes a los obtenidos mediante el embudo de decantación cónico de vidrio.

Embudo de decantación



- 2.1.2.2.5. Lupa binocular con un intervalo de 6,5 a 40 aumentos finales como mínimo.
- 2.1.2.2.6. Microscopio compuesto con un intervalo de 100 a 400 aumentos finales como mínimo con luz transmitida a campo claro. De forma complementaria pueden utilizarse la luz polarizada y el contraste diferencial interferencial.
- 2.1.2.2.7. Material de vidrio habitual de laboratorio.
- 2.1.2.2.8. Equipo para la preparación de portaobjetos: portaobjetos clásicos para microscopio, portaobjetos excavados, cubreobjetos (20 × 20 mm), pinzas, espátula fina.
- 2.1.3. Muestreo y preparación de las muestras
- 2.1.3.1. Muestreo
- Se utilizará una muestra representativa tomada de conformidad con lo dispuesto en el anexo I.

2.1.3.2. Precauciones que deben tomarse

Con el fin de evitar la contaminación cruzada en el laboratorio, todos los equipos reutilizables deberán limpiarse cuidadosamente antes de su utilización. Las piezas del embudo de decantación se desmontarán antes de la limpieza. Las piezas del embudo de decantación y el material de vidrio deberán someterse a un lavado manual previo y, seguidamente, lavarse en una máquina lavadora. Los tamices deberán limpiarse con un cepillo de cerdas sintéticas rígidas. Después de tamizar materiales grasos, como la harina de pescado, se recomienda efectuar una limpieza final de los tamices con acetona y aire comprimido.

2.1.3.3. Preparación de muestras distintas de grasa o aceite

2.1.3.3.1. Secado de la muestra: las muestras con un contenido de humedad > 14 % se secarán antes de manipularlas.2.1.3.3.2. Tamizado previo de la muestra: se recomienda tamizar previamente a 1 mm los piensos granulados y los granos y, seguidamente, preparar y analizar las dos fracciones resultantes como muestras distintas.2.1.3.3.3. Submuestras y molienda: se submuestrearán un mínimo de 50 g de la muestra para ser analizados y posteriormente se molerán.2.1.3.3.4. Extracción y preparación del sedimento: transferir una porción de 10 g (con una exactitud de 0,01 g) de la submuestra molida al embudo de decantación o vaso de precipitados de fondo cónico y añadir 50 ml de tetracloroetileno. La porción transferida al embudo se limitará a 3 g si se trata de harina de pescado u otros productos de origen animal puros, de ingredientes minerales o de premezclas que generan más de un 10 % de sedimento. Se agitará enérgicamente la mezcla durante al menos 30 s y se añadirán cuidadosamente al menos 50 ml más de tetracloroetileno, al tiempo que se lava la superficie interior del embudo para eliminar cualquier partícula que hubiera quedado adherida. La mezcla resultante se dejará reposar durante al menos 5 minutos antes de separar el sedimento abriendo el grifo de cierre.

Si se utiliza un vaso de precipitados de fondo cónico se removerá enérgicamente la mezcla durante al menos 15 s y se lavará cuidadosamente con al menos 10 ml de tetracloroetileno limpio para arrastrar cualquier partícula que se hubiera adherido a las paredes del vaso de precipitados. Se dejará reposar la mezcla durante 3 minutos y, seguidamente, volverá a removerse durante 15 s y se lavarán cuidadosamente el vaso de precipitados con al menos 10 ml de tetracloroetileno limpio para arrastrar cualquier partícula que se hubiera adherido a las paredes. La mezcla resultante se dejará reposar durante al menos 5 minutos y a continuación se retirará la fracción líquida mediante una cuidadosa decantación, velando por no perder ninguno de los sedimentos; la fracción líquida se desechará.

El sedimento se secará y posteriormente se pesará (con una exactitud de 0,001 g). Si más del 5 % del sedimento se compone de partículas > 0,50 mm, se pasará por un tamiz de 0,25 mm y se examinarán las dos fracciones resultantes.

2.1.3.3.5. Extracción y preparación del sobrenadante: tras recuperar el sedimento con el método descrito anteriormente, quedan dos fases en el embudo de decantación: una líquida consistente en tetracloroetileno y una sólida consistente en material flotante. La fase sólida es el sobrenadante y se recuperará decantando completamente el tetracloroetileno del embudo abriendo el grifo de cierre. Invertiendo el embudo de decantación, el sobrenadante se transferirá a una gran placa de Petri y se secará al aire en una campana extractora. Si más del 5 % del sobrenadante se compone de partículas > 0,50 mm, podrá pasarse por un tamiz de 0,25 mm y se examinarán las dos fracciones resultantes.2.1.3.3.6. Preparación de la materia prima: se preparará una porción de un mínimo de 5 g de la submuestra molida; si más del 5 % del material se compone de partículas > 0,50 mm, podrá pasarse por un tamiz de 0,25 mm y se examinarán las dos fracciones resultantes.

2.1.3.4. Preparación de muestras consistentes en grasa o aceite

En el análisis de muestras consistentes en grasas o aceites podrá utilizarse el siguiente protocolo:

— si la grasa es sólida, se calentará en un horno hasta su licuefacción,

— a continuación, se pipetearán 40 ml de grasa o aceite del fondo de la muestra a un tubo de centrifugación,

— se centrifugará durante 10 minutos a 4 000 revoluciones por minuto,

— si, tras la centrifugación, la grasa se hubiera solidificado, se calentará en un horno hasta su licuefacción,

— se repetirá la centrifugación durante 5 minutos a 4 000 revoluciones por minuto,

- por medio de una cucharilla o una espátula, se transferirá la mitad de las impurezas decantadas a portaobjetos de microscopía para su examen; se recomienda el glicerol como medio de montaje,
- las impurezas restantes se utilizarán para preparar el sedimento como se describe en el punto 2.1.3.3.

2.1.3.5. Utilización de reactivos de tinción

A fin de facilitar la correcta identificación de los componentes de origen animal, el analista podrá utilizar reactivos de tinción durante la preparación de la muestra, de conformidad con las directrices emitidas por el EURL-AP y publicadas en su sitio web.

En caso de que se utilice una solución de rojo de alizarina para teñir el sedimento, se aplicará el siguiente protocolo:

- el sedimento seco se transferirá a un tubo de ensayo de vidrio y se lavará dos veces con unos 5 ml de etanol (en ambas ocasiones deberá utilizarse un vórtex durante 30 s y deberá dejarse reposar el disolvente alrededor de 1 minuto 30 s antes de decantarlo),
- el sedimento se decolorará añadiendo al menos 1 ml de solución de hipoclorito de sodio; se dejará que la reacción continúe durante 10 minutos; el tubo se llenará de agua y se dejará sedimentar durante 2 a 3 minutos, tras lo cual se decantarán suavemente el agua y las partículas suspendidas,
- el sedimento se lavará dos veces más con unos 10 ml de agua (utilizar un vórtex durante 30 s, dejar reposar y decantar el agua cada vez),
- se añadirán de 2 a 10 gotas de la solución de rojo de alizarina y la mezcla se agitará con un vórtex; se dejará reaccionar 30 s y el sedimento coloreado se lavará dos veces con aproximadamente 5 ml de etanol y seguidamente una vez con acetona (en cada ocasión deberá utilizarse un vórtex durante 30 s y deberá dejarse reposar el disolvente alrededor de 1 minuto antes de decantarlo),
- por último, se secará el sedimento coloreado.

2.1.4. Examen al microscopio

2.1.4.1. Preparación de los portaobjetos

Los portaobjetos de microscopía deberán prepararse a partir del sedimento y, en función de la elección del analista, bien a partir del sobrenadante o de la materia prima. En caso de que se haya utilizado el tamiz durante la preparación de la muestra, se prepararán las dos fracciones resultantes (la fina y la gruesa). Las porciones de las fracciones destinadas al análisis esparcidas en los portaobjetos deberán ser representativas de la totalidad de la fracción.

Se preparará un número suficiente de portaobjetos con el fin de garantizar que se lleva a cabo un protocolo completo de examen como el establecido en el punto 2.1.4.2.

Los portaobjetos de microscopía se montarán con el medio de montaje adecuado, de conformidad con los PNT establecidos por el EURL-AP y publicados en su sitio web. Los portaobjetos se cubrirán con cubreobjetos.

2.1.4.2. Protocolos de observación para la detección de partículas de origen animal en piensos compuestos y material para piensos

Los portaobjetos para microscopía preparados se observarán de conformidad con los protocolos establecidos en el diagrama nº 1 para los piensos compuestos y material para piensos distintos de la harina de pescado pura, o en el diagrama nº 2 en el caso de la harina de pescado pura.

Para las observaciones microscópicas, se observarán con un microscopio compuesto el sedimento y, en función de la elección del analista, bien el sobrenadante o la materia prima. En el caso de las fracciones gruesas podrá utilizarse la lupa binocular además del microscopio compuesto. Cada portaobjetos se observará en su totalidad a diversos aumentos.

Se respetará estrictamente el número mínimo de portaobjetos que se observarán en cada etapa del protocolo de observación, salvo en caso de que la totalidad del material de la fracción no permita alcanzar el número de portaobjetos establecido. Por cada determinación no se observarán más de 6 portaobjetos.

Con el fin de facilitar la identificación del tipo y el origen de las partículas, el analista podrá utilizar herramientas de apoyo, como los sistemas de apoyo a la toma de decisiones, los bancos de imágenes y las muestras de referencia.

Diagrama nº 1

Protocolo de observación para la detección de partículas de origen animal en piensos compuestos y materiales para piensos distintos de la harina de pescado

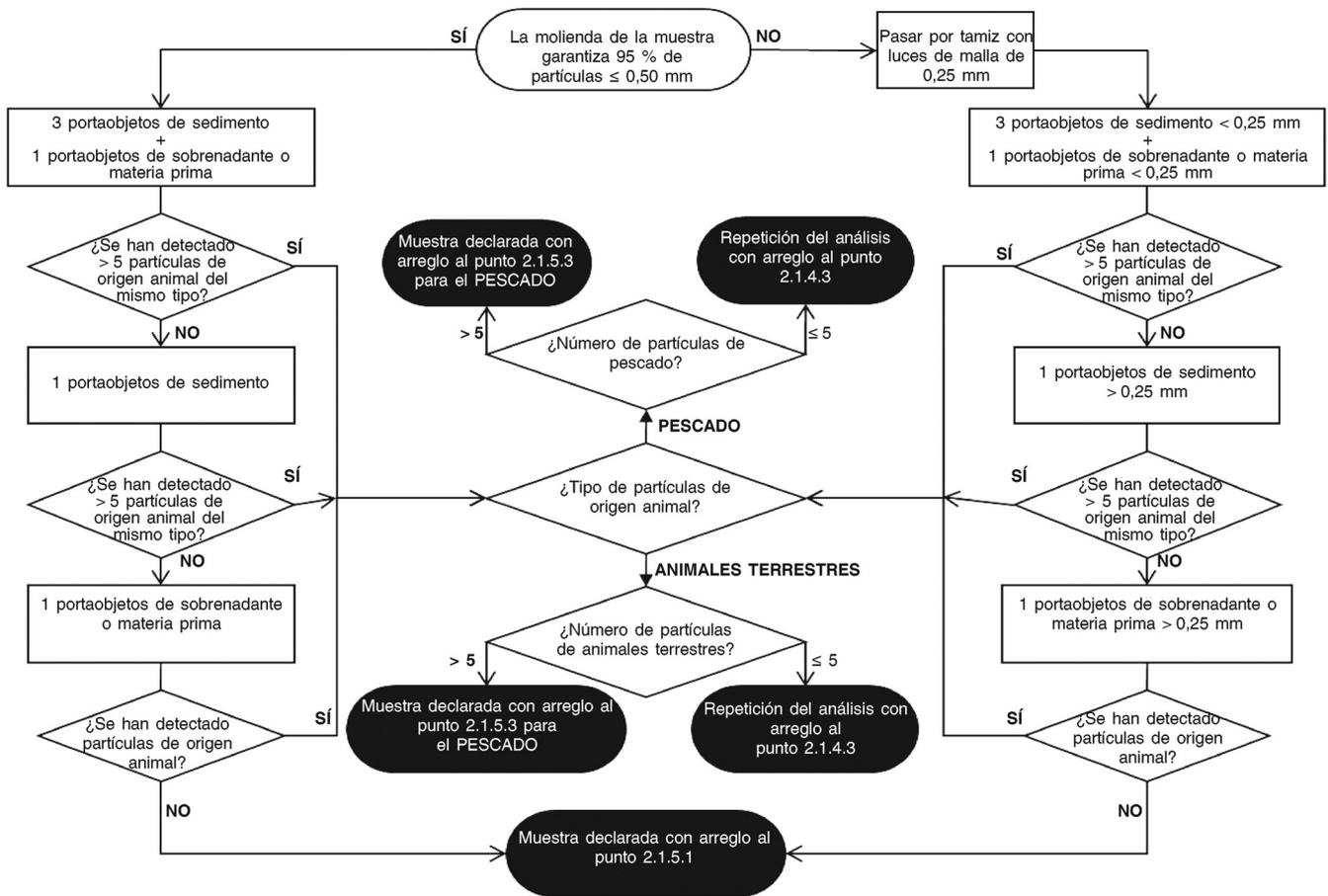
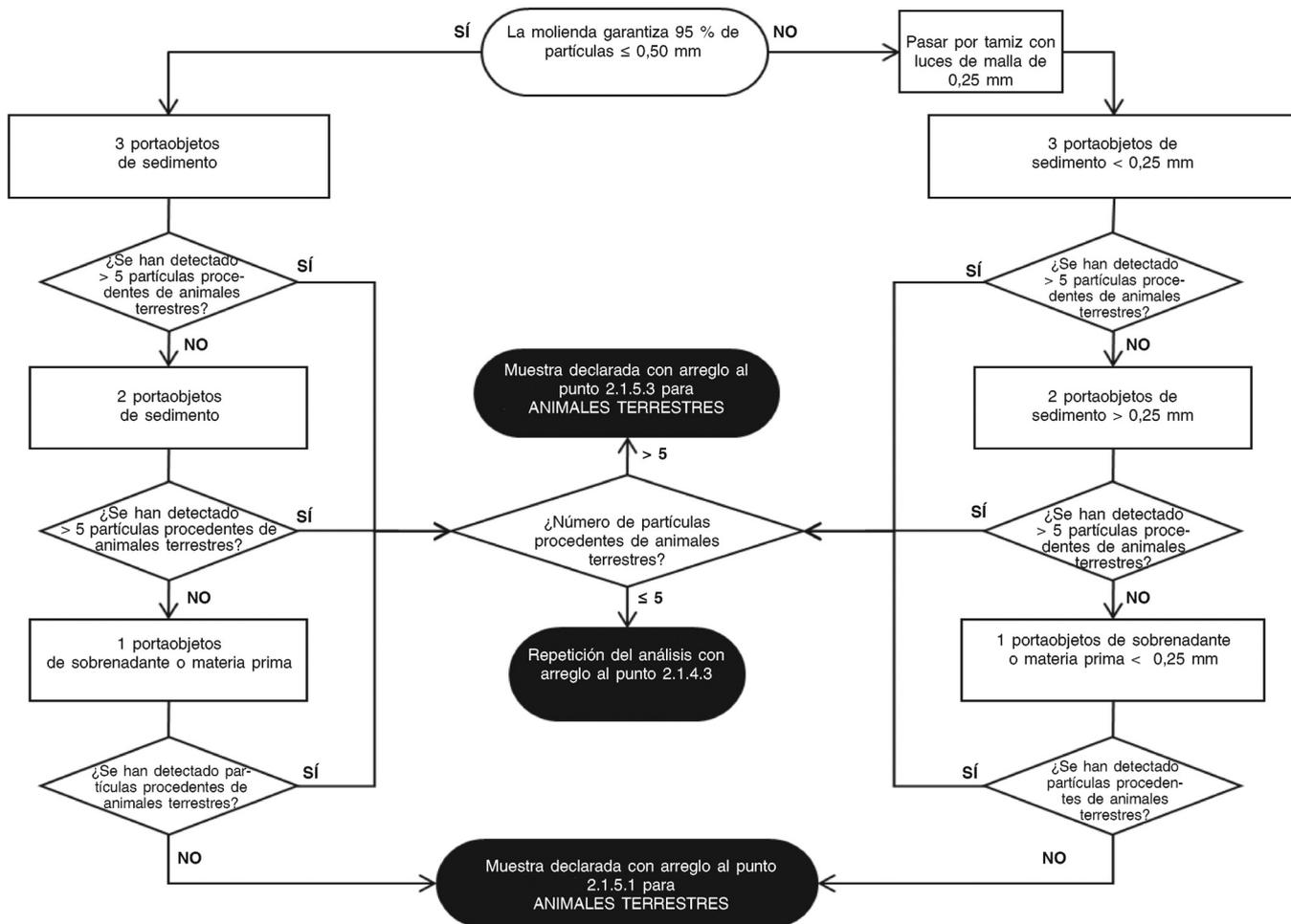


Diagrama nº 2

Protocolo de observación para la detección de partículas en la harina de pescado



2.1.4.3. Número de determinaciones

Si tras una primera determinación llevada a cabo de conformidad con los protocolos de observación establecidos en el diagrama nº 1 o en el diagrama nº 2, según proceda, no se detecta ninguna partícula de origen animal de un tipo determinado (es decir, procedente de un animal terrestre o de pescado), no será necesaria ninguna determinación complementaria y se notificará el resultado del análisis utilizando la terminología establecida en el punto 2.1.5.1.

Si tras una primera determinación llevada a cabo de conformidad con los protocolos de observación establecidos en el diagrama nº 1 o en el diagrama nº 2, según proceda, el número total de partículas animales de un tipo determinado (es decir, de un animal terrestre o de pescado) detectadas oscila entre 1 y 5, se realizará una segunda determinación de una nueva submuestra de 50 g. En caso de que, tras esta segunda determinación, el número de partículas de origen animal de dicho tipo detectadas oscile entre 0 y 5, se notificará el resultado del análisis utilizando la terminología establecida en el punto 2.1.5.2; en cualquier otro caso, se llevará a cabo una tercera determinación de una nueva submuestra de 50 g. No obstante, si después de la primera y de la segunda determinación, la suma de las partículas de un tipo determinado detectadas en los dos determinaciones fuera superior a 15, no será necesaria una determinación complementaria y se notificará directamente el resultado de los análisis utilizando la terminología establecida en el punto 2.1.5.3. Si, tras la tercera determinación, la suma de las partículas de origen animal de un tipo determinado detectadas en las tres determinaciones fuera superior a 15, se notificará el resultado del análisis utilizando la terminología establecida en el punto 2.1.5.3. En cualquier otro caso, se notificará el resultado del análisis utilizando la terminología establecida en el punto 2.1.5.2.

Si, tras una primera determinación realizada de acuerdo con los protocolos de observación establecidos en el diagrama nº 1 o en el diagrama nº 2, según proceda, se detectan más de 5 partículas de origen animal de un tipo determinado (es decir, de un animal terrestre o de pescado), se notificará el resultado de los análisis utilizando la terminología establecida en el punto 2.1.5.3.

2.1.5. *Expresión de los resultados*

Al comunicar los resultados, el laboratorio indicará en qué tipo de material se ha realizado el análisis (sedimento, sobrenadante o materia prima) y cuántas determinaciones se han llevado a cabo.

El informe del laboratorio contendrá, como mínimo, información sobre la presencia de componentes derivados de animales terrestres y de harina de pescado.

Las diversas situaciones se comunicarán de la forma que se expone a continuación.

2.1.5.1. No se ha detectado ninguna partícula de origen animal de ningún tipo determinado:

- dentro de los límites del examen con microscopio óptico, no se ha detectado en la muestra presentada ninguna partícula derivada de animales terrestres,
- dentro de los límites del examen con microscopio óptico, no se ha detectado en la muestra presentada ninguna partícula derivada de pescado.

2.1.5.2. Entre 1 y 5 partículas de origen animal de un tipo determinado detectadas como promedio:

- dentro de los límites del examen con microscopio óptico, no se han detectado en la muestra presentada más de 5 partículas derivadas de animales terrestres como promedio, por determinación; las partículas se han identificado como ... [hueso, cartílago, músculo, pelo, cuerno, etc.]; dado que este número tan reducido de partículas es inferior al límite de detección del método de examen microscópico, no puede excluirse el riesgo de falso positivo.

O, en su caso,

- dentro de los límites del examen con microscopio óptico, no se han detectado en la muestra presentada más de 5 partículas derivadas de pescado como promedio, por determinación; las partículas se han identificado como ... [espinas, escamas, cartílago, músculo, otolitos, branquias, etc.]; dado que este número tan reducido de partículas es inferior al límite de detección del método de examen microscópico, no puede excluirse el riesgo de falso positivo.

En caso de tamizado previo de la muestra, el informe del laboratorio mencionará en qué fracción (fracción tamizada, fracción granulada o granos) se han detectado las partículas de origen animal, en la medida en que la detección de las partículas de origen animal únicamente en la fracción tamizada puede ser un indicio de contaminación ambiental.

2.1.5.3. Más de 5 partículas de origen animal de un tipo determinado detectadas como promedio:

- dentro de los límites del examen con microscopio óptico, se han detectado en la muestra presentada más de 5 partículas derivadas de animales terrestres como promedio por determinación; las partículas se han identificado como ... [hueso, cartílago, músculo, pelo, cuerno, etc.].

O, en su caso,

— dentro de los límites del examen con microscopio óptico, se han detectado en la muestra presentada más de 5 partículas derivadas de pescado como promedio por determinación; las partículas se han identificado como ... [espinas, escamas, cartílago, músculo, otolitos, branquias, etc.].

En caso de tamizado previo de la muestra, el informe del laboratorio mencionará en qué fracción (fracción tamizada, fracción granulada o granos) se han detectado las partículas de origen animal, en la medida en que la detección de las partículas de origen animal únicamente en la fracción tamizada puede ser un indicio de contaminación ambiental.

2.2. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

2.2.1. Principio

Los fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) de origen animal que pueden estar presentes en materiales para piensos y en piensos compuestos se detectan mediante una técnica de amplificación genética por RCP que se centra en secuencias de ADN específicas de la especie.

El método de RCP requiere en primer lugar una fase de extracción del ADN. La etapa de amplificación se aplicará después al extracto de ADN obtenido de ese modo, a fin de detectar las especies animales diana del análisis.

2.2.2. Reactivos y equipo

2.2.2.1. Reactivos

2.2.2.1.1. Reactivos para la etapa de extracción del ADN

Se utilizarán exclusivamente reactivos aprobados por el EURL-AP y publicados en su sitio web.

2.2.2.1.2. Reactivos para la etapa de amplificación genética

2.2.2.1.2.1. Cebadores y sondas

Solamente se utilizarán cebadores y sondas con secuencias de oligonucleótidos validadas por el EURL-AP ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Mezclas de reacción (*master mix*)

Solamente se utilizarán soluciones de mezclas de reacción que no contengan reactivos que pudieran falsear los resultados debido a la presencia de ADN de origen animal ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Reactivos de descontaminación

2.2.2.1.2.3.1. Solución de ácido clorhídrico (0,1 N).

2.2.2.1.2.3.2. Lejía (solución de hipoclorito sódico al 0,15 % de cloro activo).

2.2.2.1.2.3.3. Reactivos no corrosivos para descontaminación de instrumental costoso como las balanzas analíticas (por ejemplo, DNA EraseTM de MP Biomedicals)

2.2.2.2. Equipo

2.2.2.2.1. Balanza analítica con una exactitud de 0,001 g.

2.2.2.2.2. Material de trituración.

2.2.2.2.3. Termociclador que permita la RCP en tiempo real.

2.2.2.2.4. Microcentrifugadora para tubos de microcentrifugación.

2.2.2.2.5. Juego de micropipetas que permitan pipetear desde 1 µl hasta 1 000 µl

2.2.2.2.6. Material de plástico habitual de biología molecular: tubos de microcentrifugación, puntas de plástico con filtro para micropipetas, placas adaptadas para el termociclador.

2.2.2.2.7. Congeladores para almacenar muestras y reactivos.

⁽¹⁾ En el sitio web del EURL-AP está disponible la lista de los cebadores y sondas correspondientes a cada especie animal diana del análisis.

⁽²⁾ En el sitio web del EURL-AP se puede disponer de ejemplos de mezclas de reacción.

- 2.2.3. *Muestreo y preparación de las muestras*
- 2.2.3.1. Muestreo
Se utilizará una muestra representativa tomada de conformidad con lo dispuesto en el anexo I.
- 2.2.3.2. Preparación de las muestras
La preparación de las muestras de laboratorio hasta la extracción del ADN se ajustará a los requisitos establecidos en el anexo II. Como mínimo, se submuestrearán 50 g de la muestra para ser sometidos a análisis y posteriormente molidos.
La preparación de la muestra se llevará a cabo en un habitáculo diferente al utilizado para la extracción de ADN y las reacciones de amplificación genética, tal como se describe en la norma ISO 24276.
Se prepararán dos porciones para análisis de al menos 100 mg cada una.
- 2.2.4. *Extracción del ADN*
La extracción del ADN se realizará en cada porción para análisis preparada de conformidad con los PNT establecidos por el EURL-AP y publicados en su sitio web.
Se prepararán dos controles de extracción para cada serie de extracciones según lo descrito en la norma ISO 24276:
— un control blanco de extracción,
— un control positivo de extracción del ADN.
- 2.2.5. *Amplificación genética*
La amplificación genética se llevará a cabo utilizando los métodos validados para cada especie que requiera identificación. Dichos métodos están detallados en los PNT establecidos por el EURL-AP y publicados en su sitio web. Cada extracto de ADN deberá analizarse como mínimo en dos diluciones diferentes para evaluar la inhibición.
Se prepararán dos controles de amplificación para cada especie diana, tal como se describe en la norma ISO 24276.
— para cada placa o serie de análisis de RCP se utilizará un control positivo del ADN diana,
— para cada placa o serie de análisis de RCP se utilizará un control de reactivo de la amplificación (también denominado control sin molde).
- 2.2.6. *Interpretación y expresión de resultados*
Al notificar los resultados, el laboratorio indicará al menos el peso de las porciones para análisis utilizadas, la técnica de extracción empleada, el número de determinaciones realizadas y el límite de detección del método.
No se interpretarán ni se notificarán los resultados si el control positivo de extracción de ADN y los controles positivos del ADN diana no dan resultados positivos respecto a las especies diana del análisis y el control del reactivo de amplificación es negativo.
En caso de que los resultados de las dos porciones para análisis no sean coherentes, deberá repetirse al menos la etapa de amplificación genética. Si el laboratorio sospecha que la incoherencia puede deberse a los extractos de ADN, se llevará a cabo una nueva extracción de ADN y seguidamente se realizará una amplificación genética antes de la interpretación de los resultados.
La expresión definitiva de los resultados se basará en la integración y la interpretación de los resultados de las dos porciones para análisis, de conformidad con los PNT establecidos por el EURL-AP y publicados en su sitio web.
- 2.2.6.1. Resultado negativo
Todo resultado negativo se notificará como sigue:
En la muestra presentada no se detecta ADN de X (donde X es la especie animal o grupo de especies animales diana del análisis).
- 2.2.6.2. Resultado positivo
Todo resultado positivo se notificará como sigue:
En la muestra presentada se ha detectado ADN de X (donde X es la especie animal o grupo de especies animales diana del análisis).».
-