

REGULAMENTO (UE) N.º 51/2013 DA COMISSÃO**de 16 de janeiro de 2013****que altera o Regulamento (CE) n.º 152/2009 no que respeita aos métodos de análise para a determinação dos constituintes de origem animal no quadro do controlo oficial dos alimentos para animais****(Texto relevante para efeitos do EEE)**

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 11.º, n.º 4,

Considerando o seguinte:

- (1) O artigo 7.º, n.º 1, do Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de maio de 2001, que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis ⁽²⁾, determina a proibição de alimentar ruminantes com proteínas de origem animal. Esta proibição é tornada extensiva a outros animais não ruminantes e restringida, no que diz respeito à alimentação desses animais com produtos de origem animal, em conformidade com o anexo IV daquele regulamento.
- (2) O artigo 11.º, n.º 1, do Regulamento (CE) n.º 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de outubro de 2009, que define regras sanitárias relativas a subprodutos animais e produtos derivados não destinados ao consumo humano e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1774/2002 ⁽³⁾, proíbe a alimentação de animais terrestres de uma determinada espécie, com exceção dos animais destinados à produção de peles com pelo, com proteínas animais transformadas derivadas dos corpos, ou partes de corpos, de animais da mesma espécie, bem como a alimentação de peixes de criação com proteínas animais transformadas, derivadas de corpos, ou partes de corpos, de peixes de criação da mesma espécie.
- (3) O Regulamento (CE) n.º 152/2009 da Comissão, de 27 de janeiro de 2009, que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos

para animais ⁽⁴⁾, define, no anexo VI, os métodos de análise para a determinação dos constituintes de origem animal para o controlo oficial dos alimentos para animais. O método de exame microscópico, atualmente o único método validado para detetar a presença de proteínas animais nos alimentos para animais, permite distinguir a presença de constituintes derivados de animais terrestres da presença de constituintes derivados de peixe, mas não permite avaliar com exatidão suficiente a quantidade de constituintes animais presentes nos alimentos para animais e, por conseguinte, não deve ser usado para este efeito.

- (4) Um novo método de deteção de constituintes animais com base na reação de polimerização em cadeia (PCR) foi validado pelo laboratório de referência da UE no domínio das proteínas animais em alimentos para animais. Um estudo de aplicação, organizado conjuntamente com os laboratórios nacionais de referência dos Estados-Membros, comprovou que o novo método é suficientemente robusto para ser usado como método de controlo oficial na União. Este novo método permite detetar a presença de constituintes animais em alimentos para animais, mas também identificar a espécie de origem desses constituintes. A utilização deste novo método em combinação ou em substituição, como se afigurar mais adequado, do método de exame microscópico seria bastante útil para efeitos de controlo da aplicação correta das proibições de alimentação estabelecidas nos Regulamentos (CE) n.º 999/2001 e (CE) n.º 1069/2009.
- (5) O anexo VI do Regulamento (CE) n.º 152/2009 deve, portanto, ser substituído em conformidade.
- (6) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal e nem o Parlamento Europeu nem o Conselho se lhes opuseram,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

O anexo VI do Regulamento (CE) n.º 152/2009 é substituído pelo texto constante do anexo do presente regulamento.

⁽¹⁾ JO L 165 de 30.4.2004, p. 1.⁽²⁾ JO L 147 de 31.5.2001, p. 1.⁽³⁾ JO L 300 de 14.11.2009, p. 1.⁽⁴⁾ JO L 54 de 26.2.2009, p. 1.

Artigo 2.º

O presente regulamento entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e diretamente aplicável em todos os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 16 de janeiro de 2013.

Pela Comissão
O Presidente
José Manuel BARROSO

ANEXO

«ANEXO VI

MÉTODOS DE ANÁLISE PARA A DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES DE ORIGEM ANIMAL NO QUADRO DO CONTROLO OFICIAL DOS ALIMENTOS PARA ANIMAIS**1. OBJETIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO**

A determinação de constituintes de origem animal nos alimentos para animais deve ser feita por microscopia ótica ou por reação de polimerização em cadeia (PCR), em conformidade com as disposições constantes do presente anexo.

Estes dois métodos tornam possível detetar a presença de constituintes de origem animal nas matérias-primas para alimentação animal e nos alimentos compostos para animais. No entanto, não permitem calcular a quantidade desses constituintes nas matérias-primas para alimentação animal e nos alimentos compostos para animais. Ambos os métodos têm um limite de deteção inferior a 0,1 % (m/m).

O método PCR permite identificar o grupo taxonómico dos constituintes de origem animal presentes nas matérias-primas para alimentação animal e nos alimentos compostos para animais.

Estes métodos devem aplicar-se para efeitos do controlo do cumprimento das proibições estabelecidas no artigo 7, n.º 1, e no anexo IV do Regulamento (CE) n.º 999/2001 e no artigo 11.º, n.º 1, do Regulamento (CE) n.º 1069/2009.

Em função do tipo de alimento para animais a ser testado, estes métodos podem ser usados, no âmbito de um único protocolo operacional, quer isoladamente, quer combinados, em conformidade com os procedimentos operativos normalizados (PON) estabelecidos pelo laboratório de referência da UE no domínio das proteínas animais em alimentos para animais (LRUE-PA) e publicados no respetivo sítio *web* ⁽¹⁾.

2. MÉTODOS**2.1. Microscopia ótica****2.1.1. Princípio**

Os constituintes de origem animal suscetíveis de estar presentes em matérias-primas para a alimentação animal e alimentos compostos para animais enviados para análise são identificados com base em características típicas e detetáveis por exame microscópico (por exemplo, fibras musculares e outras partículas de carne, cartilagens, ossos, chifres, pelos, cerdas, sangue, penas, cascas de ovos, espinhas e escamas).

2.1.2. Reagentes e equipamento**2.1.2.1. Reagentes****2.1.2.1.1. Agente de concentração**

2.1.2.1.1.1. Tetracloroetileno (densidade específica: 1,62).

2.1.2.1.2. Reagente de coloração

2.1.2.1.2.1. Solução de vermelho de alizarina (diluir 2,5 ml de ácido clorídrico 1 M em 100 ml de água e adicionar a esta solução 200 mg de vermelho de alizarina).

2.1.2.1.3. Meio de montagem

2.1.2.1.3.1. Solução alcalina (solução a 2,5 %, m/v, de NaOH ou solução a 2,5 %, m/v, de KOH)

2.1.2.1.3.2. Glicerol (não diluído, viscosidade: 1 490 cP)

2.1.2.1.3.3. Adesivo Ótico 65 Norland ® (viscosidade: 1 200 cP) ou resina com propriedades equivalentes para preparação de lâminas permanentes

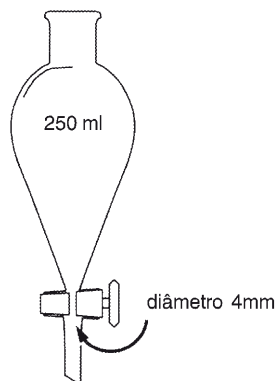
2.1.2.1.4. Meio de montagem com propriedades de coloração

2.1.2.1.4.1. Solução de Lugol (dissolver 2 g de iodeto de potássio em 100 ml de água e adicionar 1 g de iodo, agitando com frequência)

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2. Reagente de cistina (2 g de acetato de chumbo, 10 g de NaOH/100 ml de água)
- 2.1.2.1.4.3. Reagente de Fehling [preparado antes de usar a partir de partes iguais (1/1) de duas soluções-mãe A e B. Solução A: dissolver 6,9 g de sulfato de cobre (II) penta-hidratado em 100 ml de água. Solução B: dissolver 34,6 g de tartarato de potássio e sódio tetra-hidratado e 12 g de NaOH em 100 ml de água]
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogénio [dissolver 1 g de 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) em 100 ml de ácido acético glacial e 150 ml de água. Antes de usar, misturar 4 partes desta solução de TMB com uma parte de peróxido de hidrogénio a 3 %]
- 2.1.2.1.5. Agentes de lavagem
- 2.1.2.1.5.1. Etanol \geq 96 % (p.a.)
- 2.1.2.1.5.2. Acetona (p.a.)
- 2.1.2.1.6. Reagente descolorante
- 2.1.2.1.6.1. Solução comercial de hipoclorito de sódio (9-14 % de cloro ativo)
- 2.1.2.2. Equipamento
- 2.1.2.2.1. Balança analítica com uma precisão de 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Equipamento de moagem: moinho ou almofariz
- 2.1.2.2.3. Peneiros de malha quadrada com 0,25 mm e 1 mm de lado
- 2.1.2.2.4. Ampola de decantação cónica de vidro com capacidade de 250 ml com torneira de Teflon ou de vidro esmerilado na base do cone. O diâmetro de abertura da torneira deve ser \geq 4 mm. Em alternativa, pode usar-se um vaso de decantação de fundo cónico desde que o laboratório tenha demonstrado que os níveis de deteção são equivalentes aos obtidos com a ampola de decantação cónica de vidro.

Ampola de decantação



- 2.1.2.2.5. Microscópio estereoscópico que contemple, pelo menos, um intervalo de amplificação de 6,5 a 40 vezes
- 2.1.2.2.6. Microscópio composto de campo claro com luz transmitida que contemple, pelo menos, um intervalo de amplificação de 100 a 400 vezes. Pode também usar-se luz polarizada e contraste de interferência diferencial
- 2.1.2.2.7. Material de vidro de uso laboratorial corrente
- 2.1.2.2.8. Equipamento para preparação de lâminas: lâminas de microscópio, lâminas côncavas, lamelas (20 x 20 mm), pinças, espátulas finas
- 2.1.3. *Colheita e preparação das amostras*
- 2.1.3.1. Amostragem
- Utilizar uma amostra representativa, colhida de acordo com o disposto no anexo I.

2.1.3.2. Precauções a tomar

A fim de evitar contaminação cruzada no laboratório, limpar cuidadosamente todos os equipamentos reutilizáveis antes de os usar. Desmontar as peças das ampolas de decantação antes de as limpar. Pré-lavar manualmente as ampolas de decantação e os instrumentos de vidro e, de seguida, lavá-los na máquina de lavar. Limpar os peneiros com uma escova sintética rija. Recomenda-se a limpeza final dos peneiros com acetona e ar comprimido após o peneiramento de materiais gordurosos como farinhas de peixe

2.1.3.3. Preparação de amostras que não óleos ou gorduras

2.1.3.3.1. Secagem de amostras: Secar previamente as amostras com teor de humidade superior a 14 %2.1.3.3.2. Pré-peneiramento de amostras: Recomenda-se que sejam peneirados previamente em rede de 1 mm os alimentos para animais em granulado e os grãos e, subsequentemente, que sejam preparadas e analisadas as duas frações resultantes como amostras distintas.2.1.3.3.3. Subamostragem e moagem: proceder à subamostragem para análise de pelo menos 50 g da amostra e à sua subsequente moagem.2.1.3.3.4. Extração e preparação do sedimento: Transferir uma porção de 10 g (com uma aproximação de 0,01 g) da subamostra moída para a ampola de decantação ou para o vaso de decantação de fundo cónico e adicionar 50 ml de tetracloroetileno. Limitar a porção transferida para a ampola a 3 g no caso da farinha de peixe ou outros produtos de origem animal puros, ingredientes minerais ou pré-misturas que gerem mais de 10 % de sedimento. Agitar vigorosamente a mistura no mínimo 30 segundos e acrescentar cuidadosamente pelo menos mais 50 ml de tetracloroetileno, lavando a superfície interior da ampola para remover eventuais partículas aderentes. Deixar assentar a mistura resultante durante pelo menos 5 minutos antes de separar o sedimento, abrindo a torneira.

Se for usado um vaso de decantação de fundo cónico, agitar vigorosamente a mistura no mínimo 15 segundos, lavando cuidadosamente eventuais partículas aderentes aos lados interiores do vaso com pelo menos 10 ml de tetracloroetileno fresco. Deixar assentar a mistura 3 minutos e agitar novamente 15 segundos, lavando cuidadosamente eventuais partículas aderentes aos lados interiores do vaso com pelo menos 10 ml de tetracloroetileno fresco. Deixar assentar a mistura resultante pelo menos 5 minutos, retirar e rejeitar a fração líquida, decantando cuidadosamente para não perder nenhuma parte do sedimento.

Secar e depois pesar (com uma aproximação de 0,001 g) o sedimento. Se mais de 5 % do sedimento for composto por partículas superiores a 0,50 mm, peneirar em rede de 0,25 mm e analisar as duas frações resultantes.

2.1.3.3.5. Extração e preparação do sobrenadante: Após a recuperação do sedimento pelo método anteriormente descrito, duas fases restam na ampola de decantação: uma líquida composta por tetracloroetileno e uma sólida, o sobrenadante. Recuperar o sobrenadante, esvaziando completamente o tetracloroetileno da ampola pela abertura da torneira. Invertendo a ampola de decantação, depositar o sobrenadante numa placa de Petri grande e secá-lo ao ar numa *hotte* de extração. Se mais de 5 % do sobrenadante for composto por partículas superiores a 0,50 mm, peneirar em rede de 0,25 mm e analisar as duas frações resultantes.2.1.3.3.6. Preparação das matérias-primas: Preparar uma toma de pelo menos 5 g da subamostra moída. Se mais de 5 % do material for composto por partículas superiores a 0,50 mm, peneirar em rede de 0,25 mm e analisar as duas frações resultantes.

2.1.3.4. Preparação de amostras compostas por óleos ou gorduras

Na preparação de amostras compostas por óleos ou gorduras deve seguir-se o seguinte protocolo:

- se a gordura se apresentar no estado sólido, aquecer num forno até fundir,
- com uma pipeta, transferir 40 ml de óleo ou gordura da base da amostra para um tubo de centrifugação,
- centrifugar a 4 000 rpm durante 10 minutos,
- se a gordura se apresentar no estado sólido após a centrifugação, aquecer num forno até fundir,
- voltar a centrifugar a 4 000 rpm durante 5 minutos,

- usando uma pequena colher ou espátula, transferir metade das impurezas decantadas para lâminas de microscópio para análise, sendo recomendado o uso de glicerol como meio de montagem,
- utilizar as restantes impurezas para preparar o sedimento, tal como descrito no ponto 2.1.3.3.

2.1.3.5. Uso de reagentes de coloração

Para facilitar a correta identificação dos constituintes de origem animal, o operador pode usar reagentes de coloração na preparação de amostra, de acordo com as orientações emitidas pelo LRUE-PA e publicadas no respetivo sítio *web*.

Se for usada solução de vermelho de alizarina para corar o sedimento, deve aplicar-se o seguinte protocolo:

- transferir o sedimento seco para um tubo de ensaio de vidro e lavar duas vezes com aproximadamente 5 ml de etanol (utilizar um agitador de vórtex durante 30 segundos em cada lavagem e deixar a mistura em repouso durante cerca de 1 minuto e 30 segundos, para as partículas em suspensão assentarem, antes de o decantar),
- decorar o sedimento com pelo menos 1 ml de solução de hipoclorito de sódio. Deixar reagir durante 10 minutos. Encher o tubo de água, deixar assentar o sedimento durante 2-3 minutos e decantar cuidadosamente a água e as partículas suspensas,
- lavar mais duas vezes o sedimento com cerca de 10 ml de água (utilizar um agitador de vórtex durante 30 segundos, deixar assentar e decantar a água de cada vez),
- acrescentar 2 a 10 gotas de solução e vermelho de alizarina e agitar a mistura em vórtex. Deixar reagir 30 segundos e lavar o sedimento corado duas vezes com aproximadamente 5 ml de etanol e uma vez com acetona (utilizar um agitador de vórtex durante 30 segundos em cada lavagem e deixar as partículas assentarem durante cerca de um minuto antes de o decantar),
- secar o sedimento corado.

2.1.4. Exame microscópico

2.1.4.1. Preparação da lâmina

Preparar as lâminas de microscópio com o sedimento e, em função da opção do operador, com o sobrenadante ou a matéria-prima. Caso a amostra tenha sido peneirada durante a sua preparação, preparar as duas frações resultantes (a fina e a de maior granulometria). As tomas de ensaio das frações preparadas nas lâminas de montagem devem ser representativas da fração inteira.

Preparar um número suficiente de lâminas, a fim de garantir a possibilidade de realização de um protocolo de exame completo, tal como previsto no ponto 2.1.4.2.

Preparar as lâminas de microscópio com o meio de montagem adequado, de acordo com o PON estabelecido pelo LRUE-PA e publicado no respetivo sítio *web*. Cobrir as lâminas com lamelas.

2.1.4.2. Protocolos de observação para a deteção de partículas de origem animal nas matérias-primas para a alimentação animal e nos alimentos compostos para animais

Observar as lâminas de microscópio preparadas de acordo com os protocolos de observação descritos no diagrama 1 para os alimentos compostos para animais e as matérias-primas para a alimentação animal que não farinha de peixe pura, ou no diagrama 2 para farinha de peixe pura.

Proceder às observações microscópicas utilizando o microscópio composto no sedimento e, em função da opção do operador, no sobrenadante ou na matéria-prima. Para as frações de maior granulometria, pode ser também usado o microscópio estereoscópico para além do microscópio composto. Observar inteiramente cada lâmina em várias ampliações.

Respeitar estritamente o número mínimo de lâminas a observar em cada fase do protocolo de observação, a menos que a totalidade do material que compõe a fração não permita chegar ao número estipulado de lâminas. Não devem ser observadas mais do que seis lâminas por determinação.

A fim de facilitar a identificação da natureza e origem das partículas, o operador pode usar instrumentos de apoio como sistemas de apoio à decisão, bibliotecas de imagens e amostras de referência.

Diagrama 1

Protocolo de observação para a deteção de partículas de origem animal em alimentos compostos para animais e matérias-primas para a alimentação animal que não farinhas de peixe

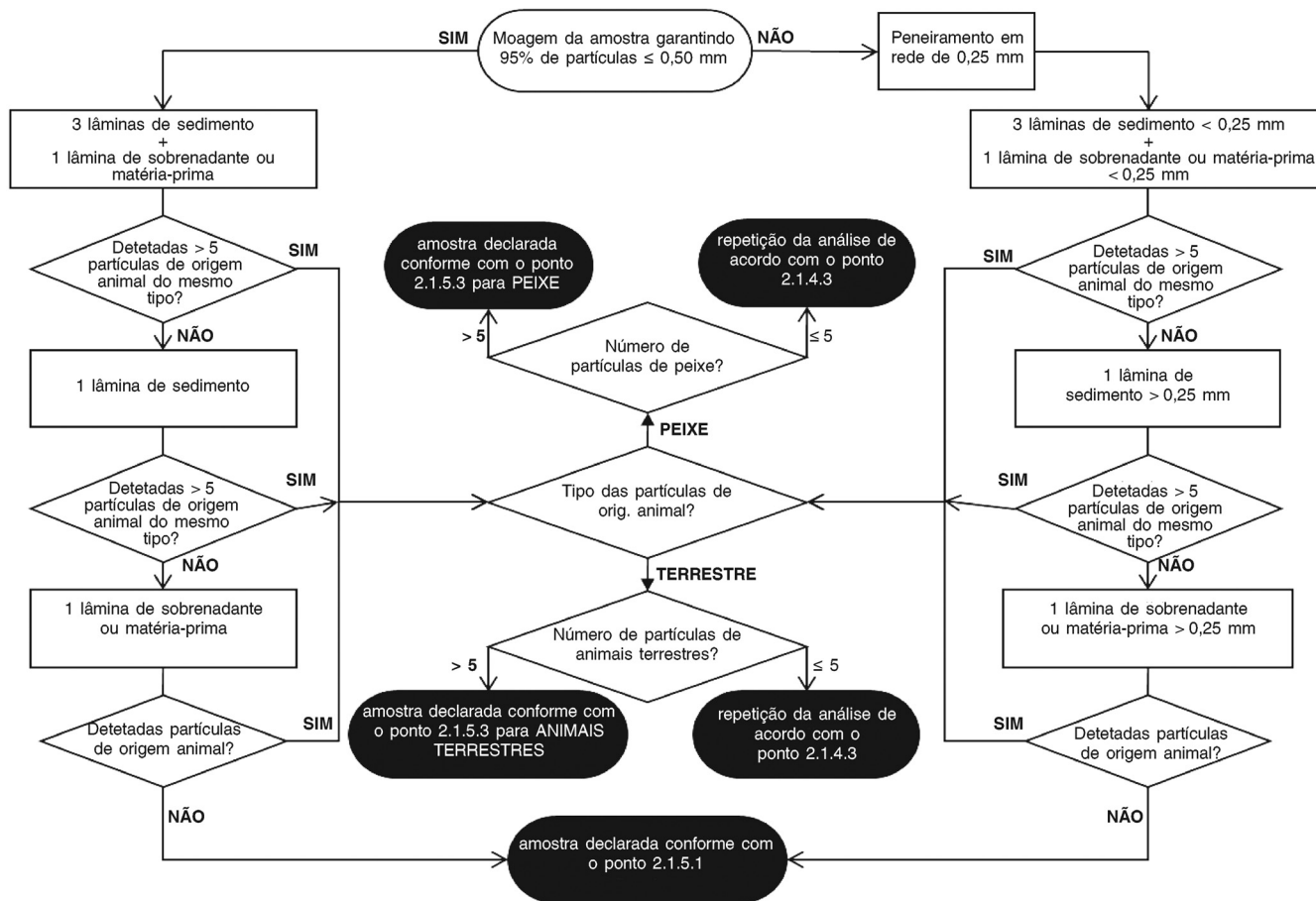
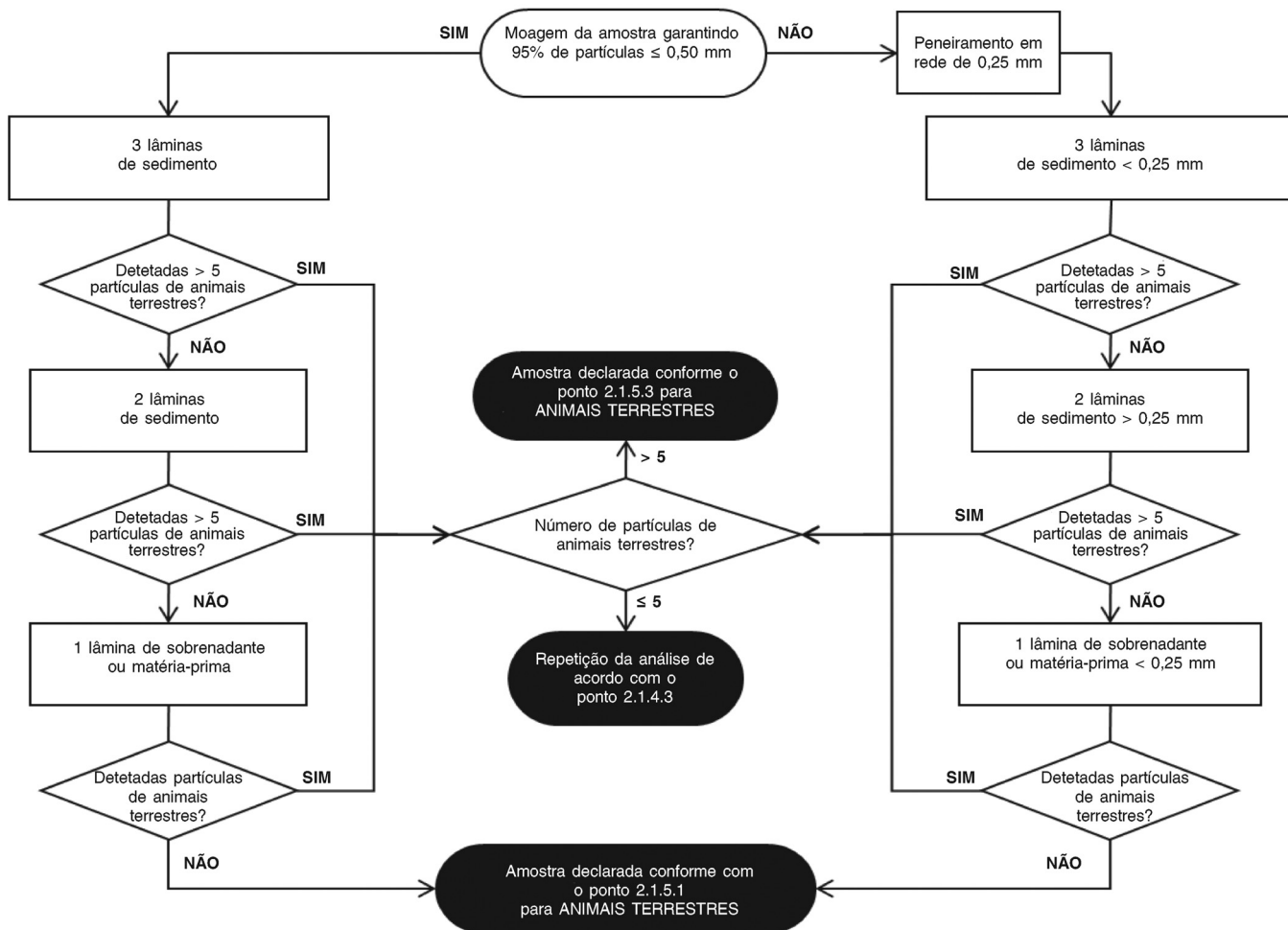


Diagrama 2

Protocolo de observação para a deteção de partículas de origem animal em farinha de peixe



2.1.4.3. Número de determinações

Se após uma primeira determinação efetuada segundo o protocolo de observação descrito no diagrama 1 ou 2 (consoante for o caso) não forem detetadas partículas de origem animal de um determinado tipo (isto é, animal terrestre ou peixe), não é necessário proceder a uma determinação adicional e o resultado da análise deve ser comunicado usando a terminologia constante do ponto 2.1.5.1.

Se após uma primeira determinação efetuada segundo o protocolo de observação descrito no diagrama 1 ou 2 (consoante for o caso) o número total de partículas de origem animal de um determinado tipo (isto é, animal terrestre ou peixe) detetado estiver entre 1 e 5, é necessário proceder a uma segunda determinação a partir de uma nova subamostra de 50 g. Se após esta segunda determinação, o número de partículas de origem animal dessa determinada espécie estiver entre 0 e 5, o resultado da análise deve ser comunicado usando a terminologia constante do ponto 2.1.5.2; se for superior a 5, deverá ser efetuada uma terceira determinação a partir de uma nova subamostra de 50 g. Não obstante, se após a primeira e a segunda determinações a soma das partículas de uma determinada espécie detetadas nas duas determinações for superior a 15, não é necessário proceder a uma determinação adicional e o resultado da análise deve ser comunicado diretamente usando a terminologia constante do ponto 2.1.5.3. Se após a terceira determinação, a soma das partículas de origem animal de um determinado tipo detetadas nas três determinações for superior a 15, o resultado da análise deve ser comunicado usando a terminologia constante do ponto 2.1.5.3. Caso contrário, o resultado da análise deve ser comunicado usando a terminologia constante do ponto 2.1.5.2.

Se após uma primeira determinação efetuada segundo o protocolo de observação descrito no diagrama 1 ou 2 (consoante for o caso) forem detetadas mais do que 5 partículas de origem animal de um determinado tipo (isto é, animal terrestre ou peixe), o resultado da análise deve ser comunicado usando a terminologia constante do ponto 2.1.5.3.

2.1.5. Expressão dos resultados

Ao comunicar os resultados, o laboratório deve indicar em que tipo de material foi efetuada a análise (sedimento, material flutuante ou matéria-prima) e quantas determinações foram efetuadas.

O relatório do laboratório deve conter, no mínimo, informações sobre a presença de constituintes originários de animais terrestres e de peixe.

As diversas situações possíveis devem ser descritas do seguinte modo:

2.1.5.1. Se não foi detetada nenhuma partícula de origem animal de um determinado tipo:

- tanto quanto foi possível observar usando um microscópio ótico, não foram detetadas partículas originárias de animais terrestres na amostra apresentada,
- tanto quanto foi possível observar usando um microscópio ótico, não foram detetadas partículas originárias de peixe na amostra apresentada.

2.1.5.2. Se foram detetadas, em média, entre 1 e 5 partículas de origem animal de um determinado tipo:

- tanto quanto foi possível observar usando um microscópio ótico, não foram detetadas, em média, mais de 5 partículas originárias de animais terrestres por determinação na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [osso, cartilagem, músculo, pelo, chifre...]. Este baixo nível de presença, sendo inferior ao limite de deteção do método microscópico, significa que não se pode excluir o risco de resultados falsos positivos.

Ou, se for o caso,

- tanto quanto foi possível observar usando um microscópio ótico, não foram detetadas, em média, mais de 5 partículas originárias de peixe por determinação na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [espinhas, escamas, cartilagem, músculo, otólito, brânquias ...]. Este baixo nível de presença, sendo inferior ao limite de deteção do método microscópico, significa que não se pode excluir o risco de resultados falsos positivos.

Em caso de amostra previamente peneirada, o relatório do laboratório deve mencionar em que fração (fração peneirada, fração granulada ou grãos) foram detetadas as partículas de origem animal, na medida em que a deteção destas partículas apenas na fração peneirada pode ser indício de contaminação ambiental.

2.1.5.3. Se foram detetadas, em média, mais de 5 partículas de origem animal de um determinado tipo:

- Tanto quanto foi possível observar usando um microscópio ótico, foram detetadas, em média, mais de 5 partículas originárias de animais terrestres por determinação na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [osso, cartilagem, músculo, pelo, chifre...].

Ou, se for o caso,

- Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, foram detetadas, em média, mais de 5 partículas originárias de peixe por determinação na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [espinhas, escamas, cartilagem, músculo, otólito, brânquias ...].

Em caso de amostra previamente peneirada, o relatório do laboratório deve mencionar em que fração (fração peneirada, fração granulada ou grãos) foram detetadas as partículas de origem animal, na medida em que a deteção destas partículas apenas na fração peneirada pode ser indício de contaminação ambiental.

2.2. PCR

2.2.1. Princípio

Os fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) de origem animal suscetíveis de estar presentes nas matérias-primas para a alimentação animal e em alimentos compostos para animais são detetados segundo uma técnica de amplificação genética de PCR, que tem como alvo sequências de ADN específicas de cada espécie.

O método por PCR implica primeiramente uma fase de extração de ADN. O extrato de ADN assim obtido é então submetido à fase de amplificação, a fim de determinar a espécie animal alvo do ensaio.

2.2.2. Reagentes e equipamento

2.2.2.1. Reagentes

2.2.2.1.1. Reagentes para a fase de extração de ADN

Usar apenas reagentes aprovados pelo LRUE-PA e publicados no respetivo *sítio web*.

2.2.2.1.2. Reagentes para a fase de amplificação genética

2.2.2.1.2.1. Primers e sondas

Usar apenas *primers* e sondas com sequências de oligonucleótidos validados pelo LRUE-PA ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Master Mix

Usar apenas soluções Master Mix que não contenham reagentes suscetíveis de conduzir a resultados falsos devido à presença de ADN animal ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Reagentes de descontaminação

2.2.2.1.2.3.1. Solução de ácido clorídrico (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Descolorante (solução de hipoclorito de sódio a 0,15 % de cloro ativo)

2.2.2.1.2.3.3. Reagentes não corrosivos para descontaminar dispositivos onerosos como balanças analíticas (por exemplo, DNA Erase™ da MP Biomedicals)

2.2.2.2. Equipamento

2.2.2.2.1. Balança analítica com uma precisão de 0,001 g

2.2.2.2.2. Equipamento de moagem

2.2.2.2.3. Termociclador que permita a realização de PCR em tempo real

2.2.2.2.4. Microcentrifugadora para tubos de microcentrifugação

2.2.2.2.5. Conjunto de micropipetas com capacidades de 1 µl a 1 000 µl

2.2.2.2.6. Equipamento em plástico de uso corrente em biologia molecular: tubos de microcentrifugação, pontas em plástico com filtro para micropipetas, placas adequadas ao termociclador.

2.2.2.2.7. Congeladores para armazenar amostras e reagentes

⁽¹⁾ A lista destes iniciadores e sondas para cada espécie animal visada pelo ensaio está disponível no *sítio web* do LRUE-PA.

⁽²⁾ Exemplos de Master Mix funcionais encontram-se disponíveis no *sítio web* do LRUE-PA.

- 2.2.3. *Colheita e preparação das amostras*
- 2.2.3.1. *Amostragem*
- Utilizar uma amostra representativa, colhida de acordo com o disposto no anexo I.
- 2.2.3.2. *Preparação da amostra*
- Preparar as amostras de laboratório até à fase de extração de ADN de acordo com os requisitos estabelecidos no anexo II. Proceder à subamostragem para análise de, pelo menos, 50 g da amostra e depois moer.
- Preparar a amostra numa sala diferente das dedicadas à extração de ADN e às reações de amplificação genética, tal como descrito na norma ISO 24276.
- Preparar duas tomas de ensaio de, pelo menos, 100 mg cada.
- 2.2.4. *Extração de ADN*
- Efetuar a extração de ADN em cada toma de ensaio preparada usando o PON estabelecido pelo LRUE-PA e publicado no respetivo sítio *web*.
- Preparar dois controlos de extração para cada série de extração, tal como descrito na norma ISO 24276.
- um controlo para o ensaio em branco da extração,
 - um controlo positivo para a extração do ADN.
- 2.2.5. *Amplificação genética*
- Realizar a amplificação genética segundo os métodos validados para cada espécie que exige identificação. Estes métodos estão descritos no PON estabelecido pelo LRUE-PA e publicado no respetivo sítio *web*. Analisar cada extrato de ADN com pelo menos duas diluições diferentes a fim de avaliar a inibição.
- Preparar dois controlos de amplificação por espécie, tal como descrito na norma ISO 24276.
- Usar um controlo positivo do ADN-alvo para cada placa ou série de ensaios por PCR,
 - Usar um controlo do reagente de amplificação (também chamado controlo negativo sem ADN) para cada placa ou série de ensaios por PCR.
- 2.2.6. *Interpretação e expressão dos resultados*
- Ao comunicar os resultados, o laboratório deve indicar pelo menos o peso das tomas de ensaio usadas, a técnica de extração usada, o número de determinações efetuadas e o limite de deteção do método.
- Não devem ser interpretados e comunicados resultados se o controlo positivo para a extração do ADN e os controlos positivos do ADN-alvo não derem resultados positivos para a espécie alvo do ensaio e o controlo do reagente de amplificação deve ser negativo.
- Caso os resultados das duas tomas de ensaio não forem coerentes, repetir pelo menos a fase de amplificação genética. Se o laboratório suspeitar que os extratos de ADN podem estar na origem da incoerência, efetuar uma nova extração de ADN e uma subsequente amplificação genética antes de interpretar os resultados.
- Basear a expressão final dos resultados na integração e na interpretação dos resultados das duas tomas de ensaio de acordo com o PON estabelecido pelo LRUE-PA e publicado no respetivo sítio *web*.
- 2.2.6.1. *Resultado negativo*
- Comunicar um resultado negativo do seguinte modo:
- Não foi detetado ADN de X na amostra apresentada (sendo X a espécie animal ou o grupo de espécies animais alvo do ensaio).
- 2.2.6.2. *Resultado positivo*
- Comunicar um resultado positivo do seguinte modo:
- Foi detetado ADN de X na amostra apresentada (sendo X a espécie animal ou o grupo de espécies animais alvo do ensaio).»
-