

DECRETO 9 settembre 2004

Metodo analitico per la determinazione dei costituenti di origine animale nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti per animali - supplemento n. 18; recepimento della direttiva 2003/126/CE.

Gazzetta Ufficiale n. 221 del 20-9-2004

IL MINISTERO DELLE POLITICHE
AGRICOLE E FORESTALI

di concerto con

IL MINISTERO DELL'ECONOMIA E DELLE FINANZE, DELLA SALUTE E DELLE
ATTIVITA' PRODUTTIVE

Visti l'art. 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, riguardante la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari, e l'art. 108 del regolamento di esecuzione dello stesso regio decreto-legge, approvato con regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nelle suddette disposizioni nazionali dovranno essere eseguite dai laboratori incaricati con i metodi prescritti da questo Ministero, di concerto con il Ministero delle finanze, il Ministero della sanita' ed il Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato;

Visti gli articoli 110, 111 e 112 del decreto del Presidente della Repubblica 12 febbraio 1965, n. 162, che prevedono, rispettivamente, l'istituzione presso questo Ministero di una commissione di studio per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi relativi ai prodotti disciplinati dal citato regio decreto-legge, la presenza in qualita' di componenti di detta commissione di rappresentanti dei Ministeri concertanti e di enti o istituti specializzati nei settori e la possibilita' che la commissione stessa sia articolata in sottocommissioni composte da esperti competenti per singole materie;

Vista la legge 7 agosto 1986, n. 462, che ha previsto l'istituzione presso il Ministero dell'agricoltura e delle foreste, dell'Ispettorato centrale repressione frodi con compiti di prevenzione e repressione delle infrazioni nella preparazione e nel commercio dei prodotti agroalimentari e delle sostanze di uso agrario e forestale;

Vista la legge 9 marzo 2001, n. 49, che ha stabilito che l'Ispettorato e' posto alle dirette dipendenze del Ministro delle politiche agricole e forestali con organico proprio ed autonomia organizzativa ed amministrativa e costituisce un autonomo centro di responsabilita' di spesa;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 18 gennaio 1988, che tra le funzioni attribuite alle divisioni dell'Ispettorato centrale repressione frodi ha previsto l'elaborazione ed aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agroalimentari e le sostanze di uso agrario e forestale;

Visto il decreto 13 febbraio 2003, n. 44, con il quale il Ministro delle politiche agricole e forestali in attuazione della legge n. 3/2001, ha provveduto alla riorganizzazione della struttura operativa dell'Ispettorato centrale repressione frodi, riconfermando, tra le funzioni attribuite agli uffici dell'amministrazione centrale, l'elaborazione e l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agroalimentari e le sostanze di uso agrario e forestale;

Visto il decreto legislativo 17 agosto 1999, n. 360, di attuazione delle direttive 96/24/CE, 96/25/CE, 98/67/CE e 87/CE, relative alla circolazione di materie prime per mangimi, che stabilisce, tra l'altro, idonee disposizioni in materia di etichettatura di prodotti il cui impiego e' vietato nella dieta dei ruminanti;

Visto il regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio, recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili, da ultimo modificato dal regolamento (CE) n. 1234/2003 della Commissione;

Visto il decreto legislativo 17 giugno 2003, n. 223, di attuazione delle direttive 2000/77/CE e 2001/46/CE, relative all'organizzazione dei controlli ufficiali nel settore dell'alimentazione animale e, in particolare, l'art. 16, comma 1.b), il quale dispone che gli accertamenti analitici sono effettuati in conformita' alle metodiche comunitarie di riferimento;

Visto il decreto ministeriale 30 settembre 1999, 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 gli animali - supplemento n. 14, emanato in attuazione della direttiva 98/88/CE;

Vista la 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 gli animali, emanata in sostituzione della direttiva 98/88/CE di cui al predetto decreto ministeriale 30 settembre 1999;

Visto il decreto ministeriale 21 settembre 1971, con il quale sono stati approvati i «Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico», modificati ed integrati da ultimo con il decreto ministeriale 28 luglio 2000 - supplemento n. 17;

Ritenuto necessario adottare le opportune disposizioni per conformare le norme nazionali a quelle comunitarie previste dalla surrichiamata direttiva 2003/126/CE;

Sentita la sottocommissione per l'aggiornamento periodico dei metodi ufficiali di analisi relativi agli alimenti per gli animali, nominata con decreto ministeriale 28 settembre 2000;

Decreta:

Art. 1.

Le analisi ufficiali, effettuate nell'ambito del programma di controllo coordinato nel settore degli alimenti per gli animali in conformita' con il decreto legislativo 17 giugno 2003, n. 223, volte ad identificare e/o a fornire una stima quantitativa dei costituenti di origine animale negli alimenti per animali, devono essere espletate in conformita' alle condizioni stabilite per l'esame microscopico riportate nel supplemento n. 18 allegato al presente decreto.

Art. 2.

1. I laboratori che effettuano i controlli ufficiali sulla presenza di costituenti di origine animale negli alimenti per animali devono partecipare periodicamente a proficiency testing al fine di verificarne la performance in relazione all'applicazione del metodo.

2. Il personale del laboratorio che effettua le analisi di cui al

comma 1, deve ricevere una adeguata formazione professionale.

Art. 3.

Il decreto ministeriale 30 settembre 1999 - supplemento n. 14, e' abrogato.

Art. 4.

Il presente decreto sara' pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana ed entra a far parte della raccolta ufficiale dei metodi nazionali.

Il presente decreto entra in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione.

Roma, 9 settembre 2004

Il Ministero delle politiche agricole e forestali
L'ispettore generale capo per la repressione delle frodi
Lo Piparo

p. Il Ministero dell'economia e delle finanze
Il direttore generale dell'Agenzia delle dogane
Guaiana

p. Il Ministero della salute
Il direttore generale della sanita' veterinaria e degli alimenti
Marabelli

p. Il Ministero delle attivita' produttive
Il direttore generale per lo sviluppo produttivo
e la competitivita'
Goti

ALLEGATO METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI

Supplemento n. 18

**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, volatili e pesci) presenti negli alimenti per animali nell'ambito del programma di controllo coordinato nel settore degli alimenti per animali in conformita' con il decreto legislativo 17 giugno 2003, n. 223.

Oltre ai metodi indicati in questo allegato, da utilizzare in tutte le analisi ufficiali, possono essere impiegati metodi diversi o alternativi, per migliorare l'identificazione di taluni tipi di costituenti di origine animale o per specificarne l'origine.

Inoltre, un protocollo analitico alternativo puo' essere utilizzato quando si esaminano alcuni tipi di costituenti animali come ad esempio il plasma o le ossa nel grasso (cfr. anche il punto 9), a condizione che tali analisi siano effettuate in aggiunta a quelle

previste nel presente allegato.

2. Sensibilita'

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

3. Principio

Un campione rappresentativo, prelevato in conformita' alle disposizioni stabilite dal D.M. 20 aprile 1978 che riporta le modalita' di prelevamento dei campioni per il controllo ufficiale degli alimenti per animali, preparato in modo adeguato, e' utilizzato per l'identificazione. Il seguente protocollo e' valido per il trattamento di alimenti a basso tenore di umidita'. Gli alimenti con un tenore di umidita' 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. Idrossido di sodio o di potassio (NaOH 2,5% w/v o KOH 2,5% w/v) per le frazioni granulometriche

4.1.3. Olio di paraffina o glicerolo (viscosita': 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 (densita' 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 cloridrico 1M in 100 ml di acqua, aggiungere 200 mg di rosso alizarina alla soluzione)

4.4.3. Reagente cistina (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)

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. Attrezzatura 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. Imbuto separatore o calice di decantazione a fondo conico

5.5. Stereomicroscopio (minimo 40 ingrandimenti)

5.6. Microscopio composto (minimo 100 ingrandimenti), in trasparenza o a luce polarizzata

5.7. Vetreria da laboratorio

Tutti gli attrezzi e le vetrerie impiegate devono essere perfettamente puliti. I setacci vanno puliti usando una spazzola a setole rigide.

6. Procedimento

Il mangime pellettato puo' essere setacciato se entrambe le parti sono analizzate come campione separato.

Da almeno 50 g del campione (macinato con cura usando gli strumenti adatti per ottenere la struttura desiderata (5.2)) 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) puo' essere utilizzata per facilitare la identificazione.

Allo scopo di indicare la natura delle proteine animali e l'origine delle particelle si puo' usare un software analizzatore di immagine tipo 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) e' 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 piu' sottili sono analizzati 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 sono trasferiti in un imbuto separatore o in un calice 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 imbuto separatore il sedimento va lasciato riposare per un tempo sufficiente (almeno 3 minuti) per permettere la separazione. Agitare di nuovo e lasciare il sedimento riposare di nuovo per almeno 3 minuti. Il sedimento si separa di nuovo.

- Se si usa un calice, il sedimento deve riposare per almeno 5 minuti per permettere la separazione.

Il sedimento totale viene fatto asciugare e conseguentemente pesato (accuratezza fino allo 0,001 g). La pesata e' necessaria unicamente nel caso in cui sia richiesta una stima. Se il sedimento e' composto da particelle di dimensioni disomogenee puo' 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 il vetrino con
| attenzione, le strutture cellulari
| sono visibili più chiaramente in
| quanto i grani di amido si
| gelatinizzano e i contenuti
| cellulari individuati sono
| rimossi.

Idrossido di Na o di K (4.1.2): | sia l'idrossido di sodio che di
| potassio chiarificano le
| particelle 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 cavità nere
| di circa 5-15 µm.

Iodio/soluzione di ioduro di potassio (4.4.1): | utilizzato per l'identificazione
| dell'amido (colore blu-violetto) e
| delle proteine (colore
| giallo-arancio). Le soluzioni
| possono essere diluite se
| necessario.

| colorazione rosso/rosa di ossa,
| lisce e scaglie. Prima di
| asciugare il sedimento (cfr.
| sezione 6.2), il sedimento totale
| va trasferito in una provetta 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 eliminato). 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. la
| provetta va riempita con acqua, il
| sedimento si lascia riposare per
| 2-3 minuti e l'acqua e le
| particelle in sospensione vanno
| eliminate. 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 piu' gocce (secondo
| la quantita' di residuo) della
| soluzione rosso alizarina vanno
| aggiunte. La miscela 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 un lavaggio di acetone
| (4.2.2) (ogni volta che si usa un
| miscelatore il solvente va
| lasciato riposare per circa un
| minuto ed eliminato). Il sedimento
Soluzione di rosso alizarina | e' ora pronto per essere
(4.4.2): | essiccato.

| con un accurato riscaldamento i
| costituenti che contengono cistina
| (peli, piume, etc.) diventano
Reagente cistina (4.4.3): | neri/marrone.

6.4. Analisi di mangimi che possono contenere farina di pesce
Almeno un vetrino dalla frazione granulometrica 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 e' sospettata o individuata
nel corso di un primo esame, vanno esaminati almeno altri due vetrini
della frazione granulometrica fine del campione originale ed il
totale della frazione del sedimento.

7. Calcolo e valutazione

La procedura descritta nel presente punto deve essere utilizzata
quando si procede ad un'analisi ufficiale allo scopo di stimare il
contenuto (e non solo la presenza) di costituenti di origine animale.
Il calcolo puo' 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 e volatili)
dai diversi tipi di ossa di pesce grazie alle tipiche lacune. La
proporzione di costituenti di origine animale nel campione di
materiale e' 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. Nei mangimi composti 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

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

% di frammenti di lische, ossa 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 di carne e 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:

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

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:

- per quanto visibile all'esame microscopico, non sono stati trovati costituenti derivati da animali terrestri nel campione esaminato.

Oppure:

- per quanto visibile all'esame microscopico, sono stati trovati costituenti derivati da animali terrestri nel campione esaminato

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

- per quanto visibile all'esame microscopico non sono stati trovati costituenti derivati da pesce nel campione esaminato.

Oppure:

- per quanto visibile all'esame microscopico sono stati trovati costituenti derivati da pesce nel campione esaminato.

Nel caso in cui siano ritrovati costituenti derivati da pesce o da animali terrestri, la relazione dei risultati può, se richiesto, 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 aggiuntiva:

"Non si puo' escludere la possibilita' che i costituenti sopra descritti provengano da mammiferi."

La frase aggiuntiva non e' necessaria qualora sia stato determinato se i frammenti ossei di animali terrestri provengano da avicoli o da mammiferi.

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

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

- Se il grasso e' solido, si scalda ad esempio in un forno a microonde fino a che non diventi liquido.
- Con una pipetta trasferire 40 ml di grasso, dalla base del campione, in un tubo di centrifugazione.
- Centrifugare per 10 minuti a 4 000 giri al minuto.
- Se il grasso e' solido dopo la centrifugazione, scaldarlo nuovamente nel forno finche' non ridiventa liquido. Ripetere la centrifugazione per 5 minuti a 4 000 giri al minuto.
- Con un cucchiaino o una spatola trasferire una meta' delle impurita' decantate in una piccola scatola di Petri o su un vetrino 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.
- La restante meta' delle impurezze e' utilizzata per la procedura come descritto al punto 6.2.