

15 JUILLET 2004. - Arrêté ministériel relatif à la méthode d'analyse pour la détermination de constituants d'origine animale dans le cadre du contrôle officiel des aliments pour animaux

Le Ministre des Affaires sociales et de la Santé publique,

Vu l'arrêté royal du 22 février 2001 organisant les contrôles effectués par l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire et modifiant diverses dispositions légales, notamment l'article 3, § 5;

Vu l'arrêté royal du 8 novembre 1998 concernant le contrôle officiel des substances destinées à l'alimentation des animaux, notamment l'article 18;

Vu la Directive 2003/126/CE de la Commission du 23 décembre 2003 relative à la méthode d'analyse applicable en matière d'identification des constituants d'origine animale pour le contrôle des aliments pour animaux, notamment l'article 1^{er};

Vu l'avis 37.277/3 du Conseil d'Etat, donné le 8 juin 2004 en application de l'article 84, § 1^{er}, alinéa 1^{er}, 1^o, des lois coordonnées sur le Conseil d'Etat,

Arrête :

Article 1^{er}. Les analyses réalisées dans le cadre du contrôle officiel, conformément à l'arrêté royal du 8 novembre 1998 concernant le contrôle officiel des substances destinées à l'alimentation des animaux, dans le but de contrôler la présence de constituants d'origine animale dans les aliments pour animaux, d'identifier ces constituants ou d'en estimer la quantité, sont effectuées conformément aux dispositions figurant à l'annexe du présent arrêté.

Art. 2. Le présent arrêté produit ses effets le 1^{er} juillet 2004.

Bruxelles, le 15 juillet 2004

R. DEMOTTE

Annexe

Conditions applicables à la détection par examen microscopique, à l'identification et à l'estimation de la quantité de constituants d'origine animale dans les aliments pour animaux

1. Objectif et champ d'application

Les présentes conditions s'appliquent à la détection de constituants d'origine animale (définis comme produits de la transformation de carcasses ou parties de mammifères, volailles ou poissons) dans les aliments pour animaux par examen microscopique, dans le cadre du programme de contrôle dans le domaine de l'alimentation animale, conformément à l'arrêté royal du 8 novembre 1998 concernant le contrôle officiel des substances destinées à l'alimentation des animaux. Pour autant que les méthodes décrites dans la présente annexe soient utilisées dans tous les tests officiels, un deuxième test peut également être effectué selon des méthodes dérivées ou autres afin d'améliorer la détection de certains types de constituants d'origine animale ou pour déterminer avec davantage de précision l'origine de ces constituants. En outre, une variante du protocole peut être utilisée pour examiner certains constituants spécifiques d'origine animale tels que le plasma ou les os présents dans le suif (voir également point 9), à condition que ces analyses se fassent en complément des analyses prévues dans le cadre de l'arrêté royal du 8 novembre 1998 précité.

2. Sensibilité

En fonction de la nature des constituants d'origine animale, de très petites quantités (< 0,1 %) peuvent être détectées dans les aliments pour animaux.

3. Principe

Un échantillon représentatif, prélevé conformément aux dispositions fixées dans l'arrêté royal du 8 novembre 1998 concernant le contrôle officiel des substances destinées à l'alimentation des animaux, et dûment préparé, est utilisé pour l'identification. Le protocole suivant convient au traitement des aliments pour animaux à faible teneur en humidité. Les aliments pour animaux présentant une teneur en humidité supérieure à 14 % sont séchés (condensés) avant le traitement. Certains aliments pour animaux et certaines matières premières destinées à l'alimentation des animaux (par exemple, les graisses et les huiles) requièrent un traitement particulier (voir point 9). Les constituants d'origine animale sont identifiés sur la base de caractéristiques typiques, identifiables au microscope (c'est à dire

fibres musculaires et autres particules de viande, cartilages, os, corne, poils, soies, sang, plumes, coquilles d'oeuf, arêtes de poisson, écailles). L'identification doit porter tant sur la fraction tamisée (6.1) que sur le résidu concentré (6.2) de l'échantillon.

4. Réactifs

4.1. Agents d'enrobage

4.1.1. Hydrate de chloral (aqueux, à 60 % en poids/volume)

4.1.2. Lessive (NaOH à 2,5 % en poids/volume ou KOH à 2,5 % en poids/volume) pour les fractions tamisées

4.1.3. Huile de paraffine ou glycérol (viscosité : 68-81) pour les observations au microscope dans le résidu

4.2. Agents de rinçage

4.2.1. Alcool, 96 %

4.2.2. Acétone

4.3. Agent de concentration

4.3.1. Tétrachloréthylène (densité 1,62)

4.4. Réactifs de coloration

4.4.1. Solution iodée/d'iodure de potassium (dissoudre 2 g d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau et ajouter 1 g d'iode en agitant fréquemment)

4.4.2. Rouge d'alizarine (diluer 2,5 ml d'acide chlorhydrique 1M dans 100 ml d'eau et ajouter 200 mg de rouge d'alizarine à cette solution)

4.4.3. Réactif cystinique (2 g d'acétate de plomb, 10 g NaOH/100 ml H₂O)

4.4.4. Solution iodée/d'iodure de potassium (dissolution dans de l'éthanol à 70 %)

4.5. Réactif de blanchiment

4.5.1. Solution commerciale d'hypochlorite de sodium (9,6 % de chlore actif)

5. Appareillage et accessoires

5.1. Balance d'analyse (précision de 0,01 g, sauf pour le résidu concentré : 0,001 g)

5.2. Instrument de broyage (broyeur ou mortier, notamment pour les aliments pour animaux dont la teneur en graisse est supérieure à 15 % au moment de l'analyse)

5.3. Tamis à mailles carrées avec ouverture de maille de 0,50 mm au maximum

5.4. Ampoule à décanter ou bécher de décantation à fond conique

5.5. Microscope stéréoscopique (grossissement 40 fois au minimum)

5.6. Microscope composé (grossissement 400 fois au minimum), lumière transmise ou lumière polarisée

5.7. Verrerie courante de laboratoire

Tout l'appareillage est soigneusement nettoyé. Les ampoules à décanter et la verrerie doivent être lavées en machine. Les tamis sont nettoyés à l'aide d'une brosse à poils durs.

6. Procédure

Les aliments pour animaux en granulés peuvent être prêtamisés si les deux fractions sont analysées en tant qu'échantillons distincts.

Au moins 50 g de l'échantillon sont traités [broyés avec soin à l'aide de l'instrument de broyage adéquat (5.2) si nécessaire afin d'obtenir une structure appropriée]. Deux portions représentatives sont prélevées du matériel broyé, l'une pour la fraction tamisée (au moins 5 g) (6.1), l'autre pour le résidu concentré (au moins 5 g) (6.2). Des agents de coloration (6.3) peuvent également être utilisés à des fins d'identification.

Pour indiquer la nature des protéines animales et l'origine des particules, il peut être fait appel à un système d'aide à la décision tel qu'ARIES, ainsi qu'à des échantillons de référence.

6.1. Identification des constituants d'origine animale dans les fractions tamisées

Au moins 5 g de l'échantillon sont passés à travers le tamis (5.3) en deux fractions.

La (les) fraction(s) tamisée(s) comportant les grosses particules (ou une partie représentative de la fraction) est (sont) étendue(s) sur un support approprié de façon à former une fine couche et observée(s) systématiquement au microscope stéréoscopique (5.5) à différents grossissements pour détecter les constituants d'origine animale.

Des lames préparées avec la (les) fraction(s) tamisée(s) comportant les particules fines sont observées systématiquement au microscope composé (5.6) à différents grossissements pour détecter les constituants d'origine animale.

6.2. Identification des constituants d'origine animale dans le résidu concentré

Au moins 5 g (précision de 0,01 g) de l'échantillon sont transvasés dans une ampoule à décanter ou un bécher de décantation à fond conique et traités avec au moins 50 ml de tetrachloréthylène (4.3.1). Le mélange est agité ou remué à plusieurs reprises.

- Si une ampoule à décanter fermée est utilisée, laisser le mélange se décanter suffisamment longtemps (au moins trois minutes) et séparer le résidu. Agiter à plusieurs reprises et laisser le mélange se décanter à nouveau pendant au moins trois minutes avant de séparer une fois encore le résidu.

- Si un bécher ouvert est utilisé, laisser le mélange se décanter pendant au moins 5 minutes avant de séparer le résidu.

Le résidu total est séché et ensuite pesé (précision de 0,001 g). La pesée ne s'impose que si une évaluation est requise. Si le résidu est composé de nombreuses grosses particules, il peut être passé à travers un tamis (5.3) en deux fractions. Le résidu séché est examiné au microscope stéréoscopique (5.5) et au microscope composé (5.6) pour détecter les constituants osseux.

6.3. Utilisation d'agents d'enrobage et de réactifs de coloration

L'identification microscopique des constituants d'origine animale peut être facilitée par l'utilisation d'agents d'enrobage et de réactifs de coloration spéciaux.

Hydrate de chloral (4.1.1) : en chauffant avec précaution, les structures des cellules se voient plus clairement en raison du gonflement des grains d'amidon et de l'évacuation des cellules indésirables.

Lessive (4.1.2) : l'hydroxyde de sodium ou l'hydroxyde de potassium nettoie la matière de l'aliment pour animaux, facilitant ainsi la détection des fibres musculaires, des poils et d'autres structures kératiniques.

Huile de paraffine et glycérol (4.1.3) : les constituants osseux peuvent être bien identifiés dans cet agent d'enrobage parce que la plupart des lacunes restent remplies d'air et apparaissent sous la forme de trous noirs de 5-15 µm environ.

Solution iodée/d'iodure de potassium (4.4.1) : est utilisée pour la détection de l'amidon (coloration bleu violet) et des protéines (coloration jaune orange). Dilution possible si nécessaire.

Solution de rouge d'alizarine (4.4.2) : coloration rouge-rose des os, arêtes de poisson et écailles. Avant de le sécher (voir section 6.2), transférer le résidu total dans une éprouvette en verre et le rincer à deux reprises avec environ 5 ml d'alcool (4.2.1) (agiter chaque fois au vortex, laisser se décanter pendant environ une minute et éliminer le solvant). Avant d'utiliser ce réactif de coloration, le résidu est blanchi en ajoutant au moins 1 ml de solution d'hypochlorite de sodium (4.5.1). Laisser réagir pendant dix minutes. Remplir le tube d'eau, laisser le mélange se décanter pendant deux à trois minutes et éliminer l'eau et les particules en suspension. Rincer le résidu à deux reprises avec environ 10 ml d'eau (agiter au vortex, laisser se décanter et éliminer l'eau chaque fois). Ajouter de deux à dix gouttes ou plus de solution de rouge d'alizarine (en fonction de la quantité de résidu). Agiter le mélange et laisser réagir quelques secondes. Rincer le résidu coloré deux fois avec environ 5 ml d'alcool (4.2.1), puis une autre fois avec de l'acétone (4.2.2) (agiter chaque fois au vortex, laisser le mélange se décanter pendant une minute environ et éliminer le solvant). Le résidu est maintenant prêt à être séché.

Réactif cystinique (4.4.3) : en chauffant avec précaution, les constituants contenant de la cystine (poils, plumes, etc.) virent au noir-brun.

6.4. Examen des aliments pour animaux susceptibles de contenir des farines de poisson

Au moins une lame préparée à partir de la fraction tamisée fine et de la fraction fine du résidu est observée au microscope composé (voir sections 6.1 et 6.2).

Si l'étiquette indique la présence de farines de poisson parmi les ingrédients ou si l'on soupçonne ou détecte la présence de farines de poisson lors de l'examen initial, au moins deux lames supplémentaires préparées à partir de la fraction tamisée fine de l'échantillon original et la fraction du résidu total sont observées.

7. Calcul et évaluation

Les procédures décrites ci-après sont suivies pour toute analyse officielle visant à évaluer la quantité (et non simplement la présence) de constituants d'origine animale.

Le calcul ne peut être fait que si les constituants d'origine animale contiennent des fragments d'os.

Les fragments d'os d'espèces terrestres à sang chaud (c'est à dire les mammifères et les oiseaux) peuvent être distingués des différents types d'arêtes de poisson sur la lame microscopique grâce aux lacunes typiques. La proportion de constituants d'origine animale dans l'échantillon est évaluée en tenant compte :

- de la proportion estimée (% poids) de fragments d'os dans le résidu concentré, et
- de la proportion (% poids) d'os dans les constituants d'origine animale.

L'estimation doit reposer sur l'observation de trois lames au moins (si possible) et de cinq champs par lame au moins. Dans les aliments composés pour animaux, le résidu concentré ne contient pas seulement des fragments d'os d'animaux terrestres et d'arêtes de poisson, mais aussi d'autres particules ayant un poids spécifique élevé, par exemple des minéraux, du sable, des fragments de végétaux lignifiés, etc.

7.1. Valeur estimée du pourcentage de fragments d'os

Pourcentage de fragments d'os terrestres = $(S \times c)/W$

Pourcentage de fragments d'arêtes et d'écailles = $(S \times d)/W$

[S = poids du résidu (mg), c = facteur de correction (%) pour la portion estimée d'os d'animaux terrestres dans le résidu, d = facteur de correction (%) pour la portion estimée de fragments d'arêtes et d'écailles dans le résidu, W = poids de l'échantillon pour la production du résidu (mg)].

7.2. Valeur estimée des constituants d'origine animale

La proportion d'os dans les produits d'origine animale peut varier considérablement. (Le pourcentage d'os est de l'ordre de 50 à 60 % pour les farines d'os et de l'ordre de 20 à 30 % pour les farines de viande; dans le cas des farines de poisson, les teneurs en arêtes et en écailles varient en fonction de la catégorie et de l'origine de la farine de poisson, mais elles sont normalement de l'ordre de 10 à 20 %.)

Si le type de farine contenu dans l'échantillon est connu, il est possible de procéder à des estimations :

Proportion estimée de constituants dérivés de produits à base d'animaux terrestres (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Proportion estimée de constituants dérivés de produits à base de poisson (%) = $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

[S = poids du résidu (mg), c = facteur de correction (%) pour la portion estimée d'os d'animaux terrestres dans le résidu, d = facteur de correction (%) pour la portion estimée de fragments d'arêtes et d'écailles dans le résidu, f = facteur de correction pour la proportion d'os dans les constituants d'origine animale dans l'échantillon examiné, W = poids de l'échantillon pour la production du résidu (mg)].

8. Expression du résultat de l'examen

Le rapport contient au minimum des informations concernant la présence de constituants dérivés d'animaux terrestres et de farines de poisson. Les différents cas sont présentés de la façon suivante :

8.1. En ce qui concerne la présence de constituants dérivés d'animaux terrestres :

- Pour autant que perceptible au microscope, aucun constituant dérivé d'animaux terrestres n'a été trouvé dans l'échantillon soumis,

ou :

- Pour autant que perceptibles au microscope, des constituants dérivés d'animaux terrestres ont été trouvés dans l'échantillon soumis.

8.2. En ce qui concerne la présence de farines de poisson :

- Pour autant que perceptible au microscope, aucun constituant dérivé de poissons n'a été trouvé dans l'échantillon soumis,

ou :

- Pour autant que perceptibles au microscope, des constituants dérivés de poissons ont été trouvés dans l'échantillon soumis.

Si des constituants dérivés de poissons ou d'animaux terrestres sont trouvés, le rapport d'examen peut, si nécessaire, donner une estimation de la quantité de constituants détectés (x %, < 0,1 %, entre 0,1 et 0,5 %, entre 0,5 et 5 % ou > 5 %) et préciser le type d'animaux terrestres (si possible) et les constituants d'origine animale identifiés (fibres musculaires, cartilage, os, corne, poils, soies, sang, plumes, coquilles d'oeuf, arêtes de poisson, écailles).

Si une estimation de la quantité d'ingrédients d'origine animale est fournie, le facteur de correction f utilisé est également mentionné.

Lorsque des os d'animaux terrestres sont détectés, la clause additionnelle suivante est insérée dans le rapport :

« La possibilité que les constituants ci-dessus proviennent de mammifères ne peut être exclue. »

Cette clause supplémentaire n'est pas requise si les fragments d'os d'animaux terrestres ont été identifiés en tant que fragments d'os de volaille ou de mammifère.

9. Protocole facultatif concernant l'analyse de graisses ou d'huiles

Le protocole suivant peut être utilisé pour l'analyse de graisses ou d'huiles :

- s'il s'agit de graisse solide, chauffer celle-ci jusqu'à ce qu'elle devienne liquide, par exemple dans un four à micro-ondes;

- pipeter 40 ml de graisse du fond de l'échantillon dans un tube de centrifugation;

- centrifuger pendant 10 minutes à 4 000 tours/minute;
 - si la graisse s'est solidifiée pendant la centrifugation, la réchauffer au four jusqu'à ce qu'elle redevienne liquide;
 - centrifuger une nouvelle fois pendant 5 minutes à 4 000 tours/minute;
 - à l'aide d'une petite cuillère ou d'une spatule, transférer une moitié des impuretés obtenues dans une petite boîte de Petri ou sur une lame microscopique en vue de détecter au microscope la présence éventuelle de constituants d'origine animale (fibres de viande, plumes, fragments d'os, etc.). Il est recommandé d'utiliser de l'huile de paraffine ou du glycérol comme agent d'enrobage pour l'examen au microscope;
 - les impuretés restantes sont utilisées pour la production du résidu, comme décrit au point 6.2.
- Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 15 juillet 2004 relatif à la méthode d'analyse pour la détermination de constituants d'origine animale dans le cadre du contrôle officiel des aliments pour animaux.

R.DEMOTTE

Publié le : 2004-08-18