

## PŘÍLOHA

## „PŘÍLOHA VI

**METODY ZKOUŠENÍ PRO STANOVENÍ SLOŽEK ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU PRO ÚŘEDNÍ KONTROLU KRMIV**

## 1. ÚČEL A ROZSAH

Identifikace složek živočišného původu v krmivech se provádí pomocí světelné mikroskopie nebo polymerázové řetězové reakce podle ustanovení uvedených v této příloze.

Tyto dvě metody umožňují zjistit přítomnost složek živočišného původu v krmných surovinách a krmných směsích. Neumožňují však výpočet množství takových složek v krmných surovinách a krmných směsích. Obě metody mají mezní hodnotu detekce nižší než 0,1 % (hmot.).

Metoda polymerázové řetězové reakce umožňuje identifikaci systematické skupiny složek živočišného původu, jež jsou přítomny v krmných surovinách a krmných směsích.

Tyto metody se použijí ke kontrole uplatňování zákazů, jež jsou stanoveny v čl. 7 odst. 1 a příloze IV nařízení (ES) č. 999/2001 a v čl. 11 odst. 1 nařízení (ES) č. 1069/2009.

V závislosti na druhu zkoušeného krmiva lze tyto metody použít v rámci jednoho operačního protokolu, a to buď jednotlivě, či ve vzájemné kombinaci v souladu se standardními operačními postupy, jež stanovila a na svých internetových stránkách zveřejnila Referenční laboratoř EU pro živočišné proteiny v krmivech (EURL-AP) <sup>(1)</sup>.

## 2. METODY

## 2.1 Světelná mikroskopie

## 2.1.1 Princip

Složky živočišného původu, jež mohou být přítomny v krmných surovinách a krmných směsích zaslaných k analýze, jsou identifikovány na základě charakteristických, mikroskopicky rozeznatelných znaků, jako jsou např. svalová vlákna a jiné masité částice, chrupavky, kosti, rohy, chlupy, štětiny, krev, peří, vaječné skořápky, rybí kosti a šupiny.

## 2.1.2 Činidla a vybavení

## 2.1.2.1 Činidla

## 2.1.2.1.1 Koncentrační přípravek

## 2.1.2.1.1.1 Tetrachlorethylen (hustota 1,62)

## 2.1.2.1.2 Činidlo k barvení

## 2.1.2.1.2.1 Roztok alizarinové červeně (2,5 ml 1M kyseliny chlorovodíkové se rozpustí ve 100 ml vody a do tohoto roztoku se přidá 200 mg alizarinové červeně).

## 2.1.2.1.3 Zalévací přípravky

## 2.1.2.1.3.1 Louh (NaOH 2,5 % hm./obj. nebo KOH 2,5 % hm./obj.)

## 2.1.2.1.3.2 Glycerol (neředěný, viskozita: 1 490 cP)

## 2.1.2.1.3.3 Norland ® Optical Adhesive 65 (viskozita: 1 200 cP) nebo pryskyřice s obdobnými vlastnostmi za účelem přípravy ustáleného podložního sklíčka

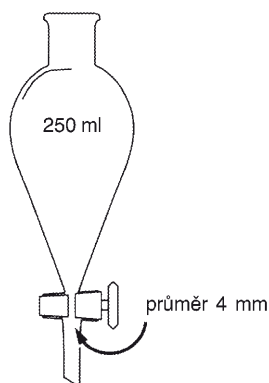
## 2.1.2.1.4 Barvicí zalévací přípravky

## 2.1.2.1.4.1 Lugolův roztok (2 g jodidu draselného se rozpustí ve 100 ml vody a přidá se 1 g jódu za častého protřepávání).

(1) <http://eurl.craw.eu/>

- 2.1.2.1.4.2 Činidlo na cystin (2 g octanu olovnatého, 10 g NaOH/100 ml vody)
- 2.1.2.1.4.3 Fehlingovo činidlo (připravuje se těsně před použitím ze dvou stejně velkých částí (1/1) ze dvou roztoků A a B. Roztok A: 6,9 g modré skalice se rozpustí ve 100 ml destilované vody. Roztok B: 34,6 g vinanu sodnodraselného tetrahydrátu a 12 g NaOH se rozpustí ve 100 ml destilované vody)
- 2.1.2.1.4.4 Tetramethylbenzidin/peroxid vodíku (1 g 3,3',5,5' tetramethylbenzidinu se rozpustí ve 100 ml ledové kyseliny octové a 150 ml destilované vody. Před použitím je nutno promíchat 4 díly roztoku tetramethylbenzidinu s 1 dílem 3 % peroxidu vodíku)
- 2.1.2.1.5 Oplachovací činidla
- 2.1.2.1.5.1 Ethanol  $\geq$  96 % (technický)
- 2.1.2.1.5.2 Aceton (technický)
- 2.1.2.1.6 Bělicí činidlo
- 2.1.2.1.6.1 Komerční roztok hypochloritu sodného (9 až 14 % aktivního chlóru)
- 2.1.2.2 Vybavení
- 2.1.2.2.1 Analytické váhy s přesností 0,001 g
- 2.1.2.2.2 Rozmělňovací zařízení: mlýnek nebo hmoždír
- 2.1.2.2.3 Síta se čtvercovými oky v šíři o rozměrech 0,25 mm a 1 mm.
- 2.1.2.2.4 Skleněná kuželovitá dělicí nálevka o objemu 250 ml s teflonovým nebo skleněným zabroušeným kohoutem na spodku kužele. Průřez kohoutu v otevřené poloze je  $\geq$  4 mm. Namísto skleněné kuželovité dělicí nálevky může být použita usazovací kádinka s kónickým dnem, prokázala-li laboratoř, že hodnoty mezní detekce odpovídají hodnotám získaným za použití skleněné kuželovité dělicí nálevky.

Dělicí nálevka



- 2.1.2.2.5 Stereoskopický mikroskop umožňující minimálně konečný rozsah zvětšení 6,5× až 40×.
- 2.1.2.2.6 Kombinovaný mikroskop umožňující minimálně konečný rozsah zvětšení 100× až 400× v jasném poli procházejícího světla. Dále lze použít i polarizační zařízení a diferenciální interferenční kontrast.
- 2.1.2.2.7 Běžné laboratorní sklo
- 2.1.2.2.8 Vybavení pro přípravu podložního sklíčka: běžná mikroskopická sklíčka, děrovaná sklíčka, krycí sklíčka (20×20 mm), pinzety, laboratorní sítěra
- 2.1.3 Odběr a příprava vzorků
- 2.1.3.1 Odběr vzorků
- Používá se reprezentativní vzorek odebraný podle postupů stanovených v příloze I.

## 2.1.3.2 Předběžná opatření

Veškeré vybavení k vícenásobnému použití se před použitím důkladně vyčistí, čímž se zabrání křížové kontaminaci v laboratoři. Před čištěním se rozebere dělicí nálevka na jednotlivé části. Jednotlivé části dělicí nálevky a skleněné vybavení se předem omývají ručně a následně se vloží do mycího zařízení. Síta se čistí kartáčem s tuhými syntetickými štětinami. Po prosívání materiálu s obsahem tuků, jako je např. rybí moučka, se na závěr doporučuje očistit síta acetonem a tlakovým vzduchem.

## 2.1.3.3 Příprava jiných vzorků, než jsou tuky či oleje

2.1.3.3.1 Vysoušení vzorku: Vzorky s obsahem vody > 14 % se před zpracováním vysuší.2.1.3.3.2 Předběžné prosévání vzorku: Doporučuje se předběžně prosít granulované a jádrové krmivo sítem o velikosti 1 mm, a následně připravit a analyzovat dvě vzniklé frakce jako samostatné vzorky.2.1.3.3.3 Dílčí vzorkování a mletí: Z alespoň 50 g vzorku se připraví dílčí vzorky za účelem provedení analýzy a následně se rozemelou.2.1.3.3.4 Extrakce a příprava sedimentu: Do dělicí nálevky nebo do usazovací kádinky s kónickým dnem se naváží nejméně 10 g (s přesností na 0,01 g) dílčího rozemletého vzorku a přidá se nejméně 50 ml tetrachlorethylenu. V případě rybí moučky nebo jiných výrobků čistě živočišného původu, minerálních složek či premixů, jež vytvářejí více než 10 % sedimentu, se navážka do dělicí nálevky sníží na 3 g. Směs se důkladně protřepává po dobu alespoň 30 s a v průběhu oplachování vnitřního povrchu dělicí nálevky za účelem odstranění jakýchkoli přilnutých pevných částic se opatrně přidává minimálně dalších 50 ml tetrachlorethylenu. Vzniklá směs se ponechá ustát po dobu alespoň pěti minut, než je otevřením kohoutu oddělen sediment.

Je-li použita usazovací kádinka s kónickým dnem, musí být směs důkladně promíchávána alespoň po dobu 15 s a veškeré pevné částice, jež přilnou na stěně usazovací kádinky, je nutné z vnitřního povrchu opatrně opláchnout alespoň 10 ml tetrachlorethylenu. Směs se ponechá ustát alespoň po dobu tří minut a následně se opět promíchá po dobu 15 s a veškeré pevné částice, jež přilnou na stěny usazovací kádinky, je nutné z vnitřního povrchu opatrně opláchnout alespoň 10 ml tetrachlorethylenu. Vzniklá směs se ponechá ustát minimálně po dobu pěti minut a následně se pomocí dekantace tekutá frakce opatrně odstraní a vylije, přičemž se dbá na to, aby nedošlo k vylití sedimentu.

Sediment se vysuší a následně zváží (s přesností na 0,001 g). Tvoří-li více než 5 % sedimentu pevné částice > 0,50 mm, je třeba jej prosít sítem o velikosti 0,25 mm, přičemž budou analyzovány tyto dvě vzniklé frakce.

2.1.3.3.5 Extrakce a příprava flotátu: po odebrání sedimentu podle výše popsané metody by v dělicí nálevce měly zůstat dvě fáze: tekutá, kterou tvoří tetrachlorethylen, a pevná z vrstvy plovoucího materiálu. Pevnou složkou je flotát, který je nutno odebrat tak, že se z nálevky otevřením výpustního kohoutu zcela vypustí tetrachlorethylen. Obrácením dělicí nálevky se flotát přemístí na velkou Petriho misku a vysuší vzduchem v laboratorní digestoři. Tvoří-li více než 5 % flotátu pevné částice > 0,50 mm, je třeba jej prosít sítem o velikosti 0,25 mm, přičemž budou analyzovány tyto dvě vzniklé frakce.2.1.3.3.6 Příprava suroviny: Připraví se navážka nejméně 5 g rozemletého dílčího vzorku. Tvoří-li více než 5 % materiálu pevné částice > 0,50 mm, je třeba jej prosít sítem o velikosti 0,25 mm, přičemž budou analyzovány tyto dvě vzniklé frakce.

## 2.1.3.4 Příprava vzorků obsahujících tuky či oleje

Pro přípravu vzorků obsahujících tuky či oleje se použije tento protokol:

— je-li tuk v pevném stavu, ohřívá se v troubě, dokud není kapalný,

— pomocí pipety se přenese 40 ml tuku či oleje ze spodní části vzorku do odstředivkové zkumavky,

— odstředí se po dobu 10 minut při 4 000 ot./min,

— pokud tuk po odstředování ztuhl, znovu se ohřeje v troubě, dokud není kapalný,

— opakuje se odstředování po dobu 5 minut při 4 000 ot./min,

- pomocí laboratorní lžičky či tyčinky se polovina dekantovaných nečistot přeneše na mikroskopická sklíčka za účelem rozboru, přičemž se doporučuje použít glycerol coby zalévací přípravek,
- zbylé nečistoty se použijí pro přípravu sedimentu podle bodu 2.1.3.3.

#### 2.1.3.5 Použití činidel k barvení

Osoba provádějící analýzu může pro usnadnění správné identifikace složek živočišného původu použít při přípravě vzorků činidla k barvení v souladu s pokyny, jež stanovila a na svých internetových stránkách zveřejnila Referenční laboratoř EU pro živočišné proteiny v krmivech (EURL-AP).

Je-li k obarvení sedimentu použit roztok alizarinové červeně, použije se tento protokol:

- Vysušený sediment se přemístí do skleněné zkumavky a dvakrát vypláchne asi 5 ml ethanolu (vždy se použije po dobu 30 s ponorný mixér, rozpouštědlo se nechá usadit po dobu 1 min. 30 s a odlije se).
- Sediment se vybělí přidáním nejméně 1 ml roztoku hypochloritu sodného. Umožní se průběh reakce po dobu 10 minut. Zkumavka se naplní vodou, sediment se nechá po dobu dvou až tří minut usadit a voda se suspendovanými částicemi se opatrně odlije.
- Sediment se dvakrát přelije 10 ml destilované vody (vždy se použije po dobu 30 s ponorný mixér, směs se nechá pokaždé usadit a odlije se destilovaná voda).
- Přidá se 2 až 10 kapek roztoku alizarinové červeně a směs se za použití ponorného mixéru rozmixuje. Reakce se ponechá probíhat po dobu 30 s a obarvený sediment se dvakrát vypláchne asi 5 ml ethanolu a následně jedenkrát acetonem (vždy se použije po dobu 30 s ponorný mixér, rozpouštědlo se nechá usadit po dobu 1 min. a odlije se).
- Obarvený sediment se vysuší.

#### 2.1.4 Mikroskopické zkoumání

##### 2.1.4.1 Příprava podložních mikroskopických sklíček

Podložní mikroskopická sklíčka se připraví ze sedimentu a dle úvahy osoby provádějící analýzu rovněž buď z flotátu, nebo suroviny. Použilo-li se během přípravy vzorku prosévání, připraví se dvě vzniklé frakce (jemná a hrubší). Navážky frakcí nanesené na podložní mikroskopická sklíčka by měly být reprezentativní pro celou frakci.

Za účelem provedení úplného zkušebního protokolu stanoveného v bodě 2.1.4.2 je třeba připravit dostatečný počet podložních sklíček.

Mikroskopická podložní sklíčka se zalijí přiměřeným zalévacím přípravkem v souladu se standardním operačním postupem, jež stanovila a na svých internetových stránkách zveřejnila Referenční laboratoř EU pro živočišné proteiny v krmivech (EURL-AP). Podložní sklíčka se zakryjí krycími sklíčky.

##### 2.1.4.2 Protokoly pozorování za účelem zjišťování živočišných částic v krmných směsích a krmných surovinách

Připravená mikroskopická podložní sklíčka se pozorují v souladu s protokoly pozorování, jež jsou stanoveny v diagramu č. 1, pokud jde o krmné směsi a krmné suroviny jiné než čistá rybí moučka, nebo v diagramu č. 2 v případě čisté rybí moučky.

Mikroskopická pozorování se provádí pomocí kombinovaného mikroskopu, přičemž je pozorován sediment a dle úvahy osoby provádějící analýzu rovněž buď flotát, nebo surovina. Pro hrubší frakce lze kromě kombinovaného mikroskopu použít i stereoskopický mikroskop. Celá plocha mikroskopického podložního sklíčka se prozkoumá při různém zvětšení.

Minimální počet mikroskopických podložních sklíček, jež mají být zkoumána, je třeba důsledně dodržet u každého z kroků protokolu pozorování s výjimkou případů, kdy celý materiál frakce neumožňuje dosažení stanoveného počtu podložních sklíček. Pozorování se provádí na jednotlivé stanovení s nejvíce 6 podložními sklíčky.

Osoba provádějící pozorování může za účelem usnadnění identifikace povahy a původu částic využít podpůrných nástrojů, jako jsou např. podpůrné systémy pro rozhodování, knihovny snímků a referenční vzorky.

Diagram 1

**Protokol pozorování za účelem zjišťování živočišných částic v krmných směsích a krmných surovinách jiných než rybí moučka**

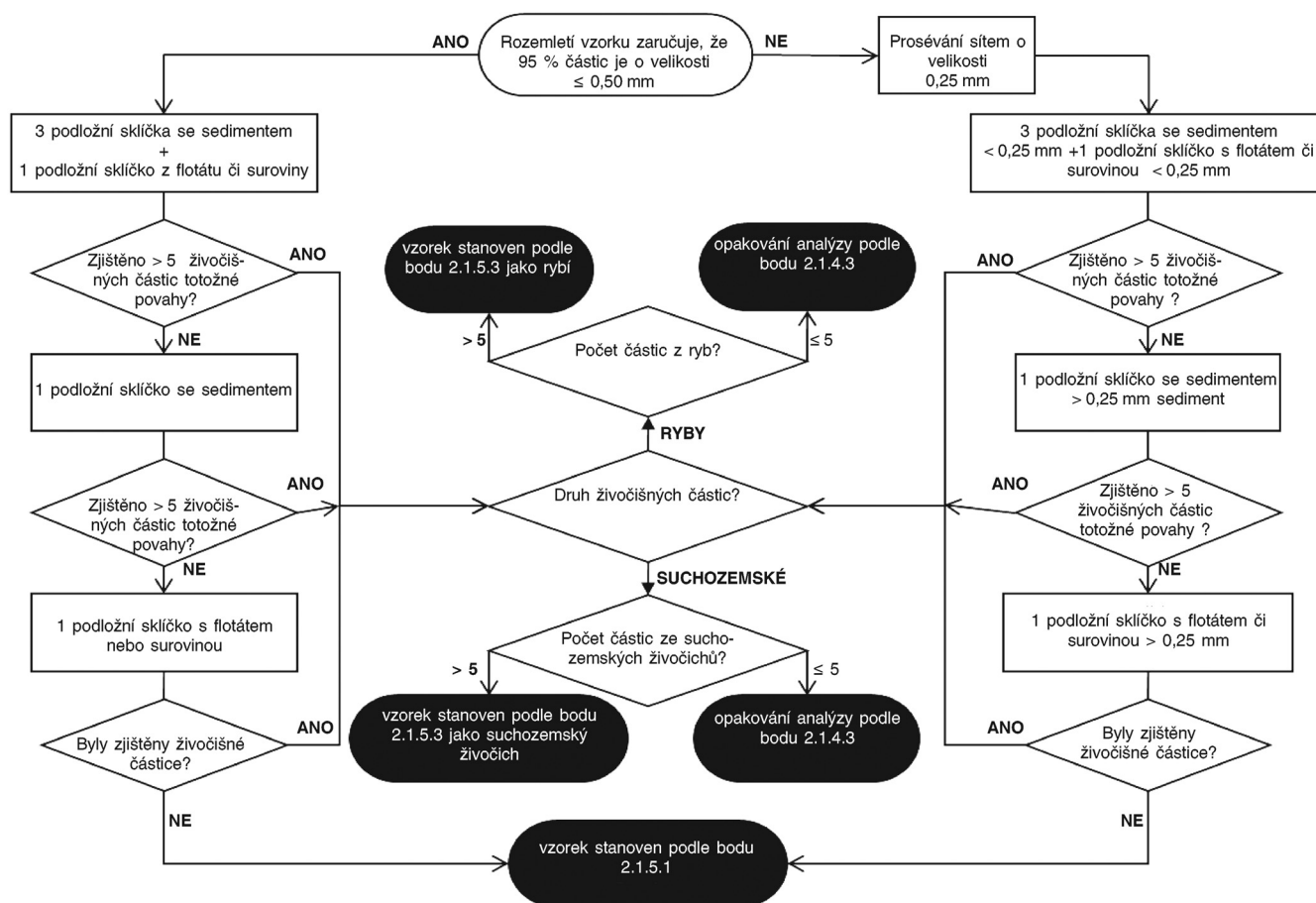
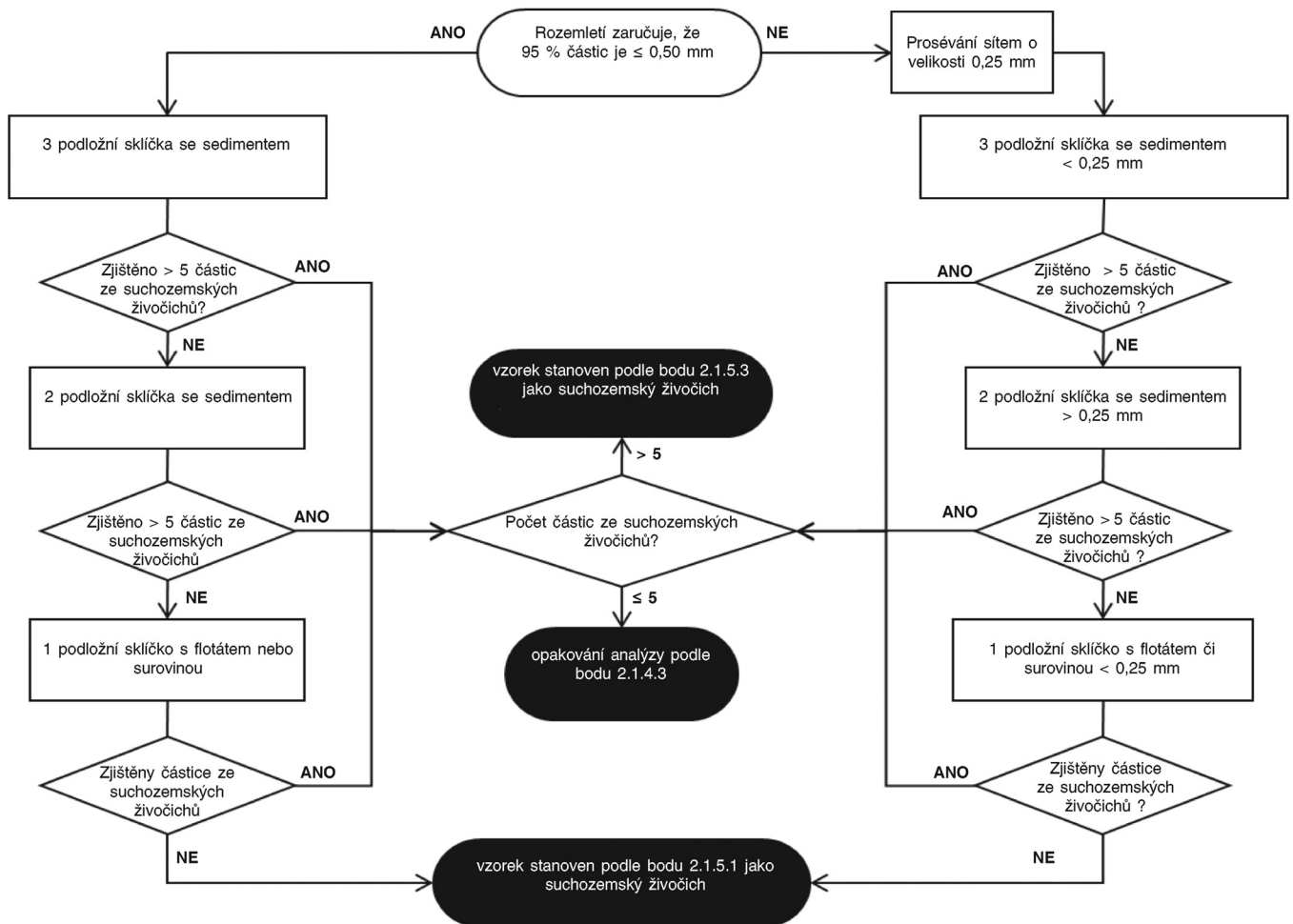


Diagram 2

## Protokol pozorování za účelem zjišťování živočišných částic v rybí moučce



## 2.1.4.3 Počet stanovení

Není-li po prvním stanovení, jež bylo provedeno v souladu s protokolem pozorování uvedeným v odpovídajícím diagramu 1 či 2, zjištěna žádná živočišná částice dané povahy (tj. ze suchozemského živočicha či ryby), není další stanovení nutné a výsledky analýzy se nahlašují za použití pojmů stanovených níže v bodě 2.1.5.1.

Pohybuje-li se po prvním stanovení, jež bylo provedeno v souladu s protokolem pozorování uvedeným v odpovídajícím diagramu 1 či 2, celkové množství zjištěných živočišných částic dané povahy (tj. ze suchozemského živočicha či ryby) v rozmezí 1 až 5, provede se druhé stanovení s novou navázkou 50 g dílčího vzorku. Pohybuje-li se po tomto druhém stanovení počet zjištěných živočišných částic dané povahy v rozmezí 0 až 5, podá se zpráva o výsledku analýzy s využitím pojmů stanovených níže v bodě 2.1.5.2, v jiných případech se provede třetí stanovení s novou navázkou 50 g dílčího vzorku. Je-li však počet částic dané povahy zjištěný během dvou stanovení vyšší než 15, není nutné další stanovení a o výsledku analýzy se přímo podá zpráva s využitím pojmů stanovených v bodě 2.1.5.3. Je-li po třetím stanovení celkový počet živočišných částic dané povahy zjištěný během tří stanovení vyšší než 15, podá se o výsledku analýzy zpráva s využitím pojmů stanovených v bodě 2.1.5.3. Jinak se o výsledku analýzy podává zpráva s využitím pojmů stanovených v bodě 2.1.5.2.

Je-li po prvním stanovení, jež bylo provedeno v souladu s protokoly pozorování uvedenými v odpovídajícím diagramu 1 či 2, zjištěno více než 5 živočišných částic dané povahy (tj. ze suchozemského živočicha či ryby), podá se o výsledku analýzy zpráva za použití pojmů stanovených níže v bodě 2.1.5.3.

## 2.1.5 Vyjádření výsledků

Při nahlašování výsledků uvede laboratoř druh materiálu, na kterém byla analýza provedena (sediment, flotát, surovina), a počet stanovení, jež byla vykonána.

Laboratorní zpráva musí obsahovat přinejmenším informace o přítomnosti složek ze suchozemských živočichů a z ryb.

Různé nálezy se nahlašují následovně:

## 2.1.5.1 Nebyla zjištěna žádná částice živočišného původu dané povahy:

- na základě mikroskopického zkoumání světelným mikroskopem nebyla v předloženém vzorku nalezena žádná částice ze suchozemských živočichů,
- na základě mikroskopického zkoumání nebyla v předloženém vzorku nalezena žádná částice z ryb.

## 2.1.5.2 Zjištěno v průměru 1 až 5 živočišných částic dané povahy:

- na základě mikroskopického zkoumání světelným mikroskopem nebylo v předloženém vzorku zjištěno v průměru více než pět částic ze suchozemských živočichů na jednotlivé stanovení. V případě zjištěných částic se jednalo o ... [kost, chrupavku, svalové vlákno, chlupy, rohy...]. Vzhledem k nízké míře přítomnosti částic, jež se nachází pod mezní hodnotou detekce při využití mikroskopické metody, nelze vyloučit riziko falešně pozitivního výsledku,

popřípadě,

- na základě mikroskopického zkoumání světelným mikroskopem nebylo v předloženém vzorku zjištěno v průměru více než pět částic z ryb na jednotlivé stanovení. V případě zjištěných částic se jednalo o ... [rybí kosti, šupiny, chrupavku, svalové vlákno, otolit, žábry...]. Vzhledem k nízké míře přítomnosti částic, jež se nachází pod mezní hodnotou detekce při využití mikroskopické metody, nelze vyloučit riziko falešně pozitivního výsledku.

Bylo-li použito předběžné prosívání vzorku, uvádí se v laboratorní zprávě frakce (prosetá frakce, granulová frakce či jádrové krmivo), v níž byly zjištěny živočišné částice, neboť zjištění živočišných částic pouze u prosévané frakce může být ukazatelem kontaminace z okolního prostředí.

## 2.1.5.3 Zjištěno v průměru více než 5 živočišných částic dané povahy:

- na základě mikroskopického zkoumání světelným mikroskopem bylo v předloženém vzorku zjištěno v průměru více než pět částic ze suchozemských živočichů na jednotlivé stanovení. V případě zjištěných částic se jednalo o ... [kost, chrupavku, svalové vlákno, chlupy, rohy...].

popřípadě,

— na základě mikroskopického zkoumání světelným mikroskopem bylo v předloženém vzorku zjištěno v průměru více než pět částic z ryb na jednotlivé stanovení. V případě zjištěných částic se jednalo o ... [rybí kosti, šupiny, chrupavku, svalové vlákno, otolit, žábry...].

Bylo-li použito předběžné prosívání vzorku, uvádí se v laboratorní zprávě frakce (prosetá frakce, granulová frakce či jádrové krmivo), v níž byly zjištěny živočišné částice, neboť zjištění živočišných částic pouze u prosévané frakce může být ukazatelem kontaminace z okolního prostředí.

## 2.2 Polymerázová řetězová reakce

### 2.2.1 Princip

Fragmenty deoxyribonukleové kyseliny (DNA) živočišného původu, jež mohou být přítomny v krmných surovinách a krmných směsích, jsou zjišťovány prostřednictvím polymerázové řetězové reakce pomocí genetické amplifikace, jež se zaměřuje na příslušné sekvence DNA jednotlivých živočišných druhů.

Metoda polymerázové řetězové reakce vyžaduje fázi extrakce DNA. Fáze amplifikace se používá na takto získaný extrakt DNA s cílem zjistit živočišné druhy, na něž je zkouška zaměřena.

### 2.2.2 Činidla a vybavení

#### 2.2.2.1 Činidla

##### 2.2.2.1.1 Činidla pro fázi extrakce DNA

Používají se pouze činidla, která schválila a na svých internetových stránkách zveřejnila Referenční laboratoř EU pro živočišné proteiny v krmivech (EURL-AP).

##### 2.2.2.1.2 Činidla pro fázi genetické amplifikace

###### 2.2.2.1.2.1 Primery a sondy

Použijí se pouze primery a sondy validované Referenční laboratoří EU pro živočišné proteiny v krmivech <sup>(1)</sup>.

###### 2.2.2.1.2.2 Master Mix

Použijí se pouze roztoky Master Mix, jež neobsahují činidla, která by mohla vést k nesprávným výsledkům z důvodu přítomnosti živočišné DNA <sup>(2)</sup>.

###### 2.2.2.1.2.3 Činidla pro dekontaminaci

###### 2.2.2.1.2.3.1 Roztok kyseliny chlorovodíkové (0,1 mol/l).

###### 2.2.2.1.2.3.2 Bělidlo (roztok hypochloritu sodného s 0,15 % aktivního chlóru)

###### 2.2.2.1.2.3.3 Činidla bez žíravých účinků pro dekontaminaci nákladných přístrojů, jako jsou např. analytické váhy (např. DNA Erase<sup>TM</sup> od společnosti MP Biomedicals)

### 2.2.2.2 Vybavení

#### 2.2.2.2.1 Analytické váhy s přesností 0,001 g

#### 2.2.2.2.2 Rozměňovací zařízení

#### 2.2.2.2.3 Termocykler umožňující polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase

#### 2.2.2.2.4 Mikroodstředivka pro zkumavky do mikroodstředivky

#### 2.2.2.2.5 Sada mikropipet umožňujících pipetování od 1 µl do 1 000 µl

#### 2.2.2.2.6 Běžné plastové vybavení pro molekulární biologii: zkumavky pro mikroodstředivky, plastové špičky mikropipet s filtrem, vhodné misky pro termocykler

#### 2.2.2.2.7 Mrazicí boxy k uchování vzorků a činidel

<sup>(1)</sup> Seznam těchto primerů a sond je pro jednotlivé druhy živočichů k dispozici na internetových stránkách Referenční laboratoře EU pro živočišné proteiny v krmivech.

<sup>(2)</sup> Příklady Master Mixů, jež lze použít, jsou k dispozici na internetové stránce Referenční laboratoře EU pro živočišné proteiny v krmivech.



- 2.2.3 *Odběr a příprava vzorků*
- 2.2.3.1 *Odběr vzorků*  
Používá se reprezentativní vzorek odebraný podle postupů stanovených v příloze I.
- 2.2.3.2 *Příprava vzorků*  
Příprava laboratorních vzorků pro extrakci DNA musí splňovat požadavky stanovené v příloze II. Alespoň 50 g vzorku by mělo být rozděleno na dílčí vzorky pro účely analýzy a následně rozemleto.  
Příprava vzorku probíhá v jiné místnosti, než je místnost určená k extrakci DNA a k reakcím genetické amplifikace, jak je stanoveno v normě ISO 24276.  
Připraví se dvě navážky vzorku, každá minimálně o hmotnosti 100 mg.
- 2.2.4 *Extrakce DNA*  
Extrakce DNA se provede u každé navážky vzorku připravené podle standardního operačního postupu, jež stanovila a na svých internetových stránkách zveřejnila Referenční laboratoř EU pro živočišné proteiny v krmivech (EURL-AP).  
Pro každou ze sérií navážek k extrakci se připraví dvě extrakční kontroly, jak je stanoveno v normě ISO 24276:  
— jedna slepá extrakční kontrola,  
— jedna extrakční kontrola pozitivní DNA.
- 2.2.5 *Genetická amplifikace*  
Genetická amplifikace se provádí s využitím metod validovaných pro každý druh, který vyžaduje identifikaci. Tyto metody jsou stanoveny ve standardním operačním postupu, jež stanovila a na svých internetových stránkách zveřejnila Referenční laboratoř EU pro živočišné proteiny v krmivech (EURL-AP). Každý extrakt DNA se analyzuje alespoň ve dvou rozdílných ředěních, aby bylo možné vyhodnotit inhibici.  
Pro každý cílový druh se připraví dvě kontroly amplifikace, jak je stanoveno v normě ISO 24276:  
— kontrola pozitivní cílové DNA se použije pro každé z plat či pro každou ze sérií zkoušek prostřednictvím polymerázové řetězové reakce,  
— kontrola amplifikačních činidel (nazývaná rovněž beztemplátová kontrola) se použije pro každé z plat či pro každou ze sérií zkoušek prostřednictvím polymerázové řetězové reakce.
- 2.2.6 *Interpretace a vyjádřování výsledků*  
Při nahlašování výsledků uvádí laboratoř minimálně hmotnost použitých navážek vzorku, použitý způsob extrakce, počet provedených stanovení a mezní hodnotu detekce dané metody.  
Výsledky se neinterpretují a neohlašují, pokud extrakční kontrola pozitivní DNA a kontroly pozitivní cílové DNA nejsou pro zkoumaný cíl pozitivní a zároveň je kontrola amplifikačních činidel negativní.  
V případě neslučitelných výsledků ze dvou navážek vzorku se zopakuje alespoň fáze genetické amplifikace. Domnívá-li se laboratoř, že neslučitelnosti by mohly být zapříčiněny extrakty DNA, provede se před vypočtením výsledků nová extrakce DNA a následná genetická amplifikace.  
Konečné vyjádření výsledků vychází z integrace a interpretace výsledků dvou navážek vzorku v souladu se standardním operačním postupem, jež stanovila a na svých internetových stránkách zveřejnila Referenční laboratoř EU pro živočišné proteiny v krmivech (EURL-AP).
- 2.2.6.1 *Negativní výsledek*  
Negativní výsledek se oznamuje takto:  
V předloženém vzorku nebyla zjištěna žádná DNA z X (přičemž X označuje živočišný druh či skupinu živočišných druhů, na který či na kterou byla zkouška zaměřena).
- 2.2.6.2 *Pozitivní výsledek*  
Pozitivní výsledek se oznamuje takto:  
V předloženém vzorku byla zjištěna DNA z X (přičemž X označuje živočišný druh či skupinu živočišných druhů, na který či na kterou byla zkouška zaměřena).“
-