

DIRECTIVA 2003/126/CE DE LA COMISIÓN
de 23 de diciembre de 2003
relativa a los métodos de análisis para determinar los componentes de origen animal a los efectos
del control oficial de los piensos
(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 70/373/CEE del Consejo, de 20 de julio de 1970, relativa a la introducción de métodos para la toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal ⁽¹⁾ y, en particular, su artículo 2,

Considerando lo siguiente:

- (1) La Directiva 70/373/CEE establece que los controles oficiales de la alimentación animal, efectuados con objeto de comprobar que se cumplen las condiciones prescritas en las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas referentes a su calidad y composición, deben efectuarse siguiendo métodos comunitarios de toma de muestras y de análisis.
- (2) Las disposiciones en materia de etiquetado de los piensos y las que prohíben el uso de ciertos tipos de proteínas animales en la alimentación animal destinadas a determinadas categorías de animales exigen crear métodos de análisis fiables para detectar la presencia y, en su caso, el porcentaje de dichas proteínas.
- (3) El método descrito en la Directiva 98/88/CE de la Comisión, de 13 de noviembre de 1998, por la que se establecen las directrices para la identificación de los componentes de origen animal y el cálculo de sus cantidades mediante microscopio a los efectos del control oficial de los piensos ⁽²⁾ es actualmente el único método validado para comprobar la presencia en los piensos de proteínas animales, incluidas las tratadas a 133 °C y 3 bar durante 20 minutos.
- (4) Un reciente estudio comparativo sobre la determinación de proteínas animales transformadas ha demostrado que las variaciones en la aplicación de los exámenes microscópicos establecidos en la Directiva 98/88/CE producen diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad, la especificidad y la precisión del método. La armonización y la mejora de la determinación de proteínas animales transformadas requiere que las disposiciones relativas al método de examen microscópico se especifiquen con mayor precisión y sean obligatorias. Resulta necesario garantizar que los analistas que aplican el método hayan recibido la formación adecuada, dado que los resultados dependen de la pericia del analista.
- (5) La Directiva 98/88/CE debe, por tanto, sustituirse.

- (6) Las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros velarán por que al realizarse, en el marco del programa coordinado de controles en el ámbito de la alimentación animal establecido en la Directiva 95/53/CE del Consejo ⁽³⁾, un examen oficial para comprobar la presencia, identificar y/o estimar la cantidad de componentes de origen animal presentes en los piensos, dicho examen se realice de conformidad con lo dispuesto en el anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

Los Estados miembros velarán por que los laboratorios que realicen los controles oficiales de la presencia de componentes animales en los piensos participen periódicamente en pruebas de competencia en los métodos de análisis y por que el personal de laboratorio que realiza los análisis reciba la formación adecuada.

Artículo 3

Queda derogada la Directiva 98/88/CE.

Las referencias a la Directiva derogada se entenderán referidas a la presente Directiva.

Artículo 4

1. Los Estados miembros adoptarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir la presente Directiva, a más tardar, el 1 de julio de 2004. Comunicarán inmediatamente a la Comisión el texto de dichas disposiciones y un cuadro de correspondencia entre ellas y las disposiciones de la presente Directiva.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

2. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la presente Directiva.

⁽¹⁾ DO L 170 de 3.8.1970, p. 2; Directiva cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 807/2003 (DO L 122 de 16.5.2003, p. 36).

⁽²⁾ DO L 318 de 27.11.1998, p. 45.

⁽³⁾ DO L 265 de 8.11.1995, p. 17; Directiva cuya última modificación la constituye la Directiva 2001/46/CE (DO L 234 de 1.9.2001, p. 55).

Artículo 5

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

Artículo 6

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 23 de diciembre de 2003.

Por la Comisión

David BYRNE

Miembro de la Comisión

ANEXO

Condiciones para la detección, identificación o estimación, mediante examen microscópico, de los componentes de origen animal presentes en los piensos**1. Objetivo y ámbito de aplicación**

Las presentes condiciones se aplicarán al realizar exámenes microscópicos para detectar la presencia de componentes de origen animal (definidos como productos derivados del procesado de cuerpos y partes de cuerpos de mamíferos, aves de corral y pescado) en el marco del programa coordinado de controles en el ámbito de la alimentación animal establecido en la Directiva 95/53/CE. Si se utilizan todos los métodos del presente anexo en todos los exámenes oficiales, podrá también efectuarse un segundo examen, utilizando variantes de los métodos o métodos alternativos, para mejorar la detección de determinados tipos de componentes de origen animal o precisar más el origen de dichos componentes. Por otra parte, en el examen de determinados componentes animales específicos, como la presencia de plasma o huesos en el sebo (véase el punto 9), podrá utilizarse una variante del protocolo, a condición de que esos análisis se realicen como complemento de los previstos en el programa coordinado de control.

2. Sensibilidad

En función de su naturaleza, las cantidades de componentes de origen animal de los piensos que pueden detectarse son muy pequeñas (< 0,1 %).

3. Principio

Para la identificación se utiliza una muestra representativa y preparada de forma adecuada, tomada de conformidad con lo dispuesto en la Directiva 76/371/CEE de la Comisión, de 1 de marzo de 1976, sobre determinación de modos comunitarios de toma de muestras para el control oficial de la alimentación animal (¹). El siguiente protocolo es apto para tratar piensos con bajo contenido de humedad. Los piensos con un contenido de humedad superior al 14 % deberán secarse (condensarse) antes de ser tratados. Determinados alimentos animales (por ejemplo, grasas y aceites) requieren un tratamiento específico (véase el punto 9). Los componentes de origen animal se identifican a partir de características típicas microscópicamente identificables (por ejemplo, fibras musculares y otras partículas de carne, cartílago, huesos, cuerno, pelo, cerdas, sangre, plumas, cáscaras de huevo, huesos o escamas de pescados). La identificación debe realizarse tanto a partir de la fracción de tamiz (6.1) como del sedimento concentrado (6.2) de la muestra.

4. Reactivos**4.1. Agentes de imbibición**

4.1.1. Hidrato de cloral (acuoso, 60 % peso/volumen)

4.1.2. Lejía (NaOH 2,5 % peso/volumen o KOH 2,5 % peso/volumen) para fracciones de tamiz

4.1.3. Aceite de parafina o glicerol (viscosidad: 68-81) para las observaciones microscópicas en el sedimento

4.2. Agentes de lavado

4.2.1. Alcohol, 96 %

4.2.2. Acetona

4.3. Agente de concentración

4.3.1. Tetracloroetileno (densidad 1,62)

4.4. Reactivos de coloración

4.4.1. Solución de yodo/yoduro de potasio (disolver 2 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua y añadir 1 g de yodo, agitando frecuentemente)

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

4.4.3. Reactivo de cistina (2 g de acetato de plomo, 10 g de NaOH/100 ml de agua)

4.4.4. Solución de yodo/yoduro potásico

(¹) DO L 102 de 15.4.1976, p. 1.

4.5. *Reactivo decolorante*

4.5.1. Solución comercial de hipoclorito de sodio (9,6 % de cloro activo)

5. **Equipo y accesorios**

5.1. Balanza analítica (precisión de 0,01 g salvo para el sedimento concentrado: 0,001 g)

5.2. Material de trituración (trituradora o mortero, especialmente para los alimentos con más del 15 % de grasa en análisis).

5.3. Tamiz de malla cuadrada con orificios de 0,50 mm de lado como máximo

5.4. Ampolla de decantación o vaso de precipitados de fondo cónico

5.5. Microscopio estereoscópico (mínimo: 40 aumentos)

5.6. Microscopio compuesto (mínimo: 400 aumentos) de luz transmitida o polarizada

5.7. Material de vidrio normal de laboratorio

Todo el equipo se limpiará a fondo. Los embudos de separación y el material de vidrio deben lavarse en máquina lavadora. Los tamices deben limpiarse con un cepillo de cerdas rígidas.

6. **Procedimiento**

Los alimentos granulados pueden tamizarse previamente si ambas fracciones se analizan como muestras distintas.

Se tratarán al menos 50 g de muestra (cuidadosamente molidos, si fuera necesario mediante el equipo adecuado (5.2), para lograr una estructura apropiada). Tomar dos partes representativas de la materia molida, una para la fracción de tamiz (al menos 5 g) (6.1) y otra para el sedimento concentrado (al menos 5 g) (6.2). Para facilitar la identificación, pueden utilizarse también reactivos de coloración (6.3).

Para indicar la naturaleza de las proteínas animales y el origen de las partículas, puede utilizarse un sistema de apoyo a la toma de decisiones (como ARIES) y aportar muestras de referencia.

6.1. *Determinación de componentes de origen animal en las fracciones de tamiz*

Se tamizará un mínimo de 5 g de la muestra (5.3) en dos fracciones

La fracción o fracciones de tamiz con partículas grandes (o una parte representativa de la fracción) se aplicarán en una capa fina a un soporte adecuado y se observarán sistemáticamente mediante el microscopio estereoscópico (5.5) y en diversas ampliaciones para comprobar la presencia de componentes de origen animal.

Las láminas hechas con la fracción o fracciones de tamiz con partículas finas se observarán sistemáticamente al microscopio compuesto (5.6) en diversas ampliaciones para comprobar la presencia de componentes de origen animal.

6.2. *Determinación de componentes de origen animal del sedimento concentrado*

Se transferirá un mínimo de 5 g (precisión de 0,01 g) de la muestra a una ampolla de decantación o un vaso de precipitados de fondo cónico y se tratará al menos con 50 ml de tetracloroetileno (4.3.1). La mezcla se agitará o se revolverá en varias ocasiones.

— Si se utiliza una ampolla de decantación cerrada, el sedimento deberá dejarse reposar durante suficiente tiempo (al menos 3 minutos) antes de separarlo. A continuación volverá a agitarse y a dejarse reposar durante al menos 3 minutos. Seguidamente el sedimento volverá a separarse.

— Si se utiliza un vaso abierto, el sedimento se dejará reposar durante al menos 5 minutos antes de separarlo.

El total del sedimento se secará y posteriormente se pesará (precisión de 0,001 g). El pesaje será sólo necesario en caso de que se requiera una estimación. Si el sedimento contiene muchas partículas grandes, puede tamizarse (5.3) en dos fracciones. El sedimento seco se examinará para buscar componentes óseos al microscopio estereoscópico (5.5) y el microscopio compuesto (5.6).

6.3. *Uso de agentes de imbibición y de reactivos de coloración*

La determinación microscópica de los componentes de origen animal puede verse facilitada mediante el uso de agentes de imbibición y reactivos de coloración especiales como:

Hidrato de cloral (4.1.1):	al calentarse cuidadosamente, las estructuras celulares pueden apreciarse más claramente, gracias a que los granos de almidón gelatinizan y se elimina el contenido celular no deseado.
Lejía (4.1.2):	tanto el hidróxido de sodio como el hidróxido de potasio clarifican las materias constitutivas de los piensos, lo que ayuda a detectar fibras musculares, pelos y otras estructuras queratínicas.
Aceite de parafina y glicerol (4.1.3):	los componentes óseos pueden identificarse bien en este agente de imbibición, gracias a que la mayor parte de las lagunas se mantienen llenas de aire y aparecen como agujeros negros de 5-15 µm.
Solución de yodo/yoduro de potasio (4.4.1):	se utiliza para la detección de almidón (azul violáceo) y proteínas (amarillo anaranjado). Si es necesario, las soluciones pueden diluirse.
Solución roja de alizarina (4.4.2):	colorante rojo/rosado de huesos, espinas y escamas de pescados. Antes de secar el sedimento (véase el punto 6.2), el sedimento total se transferirá a un tubo de ensayo de vidrio y se lavará dos veces con aproximadamente 5 ml de alcohol (4.2.1) (en cada lavado se utilizará un agitador mecánico y se dejará reposar el disolvente durante aproximadamente un minuto antes de decantarlo). Antes de utilizar este reactivo de coloración, el sedimento se blanqueará añadiendo al menos 1 ml de solución de hipoclorito de sodio (4.5.1). Dejar reaccionar durante 10 minutos. El tubo se llenará de agua y se dejará sedimentar durante 2-3 minutos, tras lo cual se decantarán el agua y las partículas suspendidas. El sedimento se lavará dos veces más con aproximadamente 10 ml de agua (utilizar un agitador mecánico, dejar reposar y decantar el agua cada vez). Añadir entre 2 y 10 gotas o más (dependiendo de la cantidad de residuo) de la solución roja de alizarina. Agitar la mezcla y dejar reaccionar algunos segundos. Aclarar el sedimento coloreado dos veces con aproximadamente 5 ml de alcohol (4.2.1) y seguidamente enjuagar una vez con acetona (4.2.2) (cada vez que se use el agitador mecánico, dejar reposar el disolvente alrededor de un minuto y decantar). Será entonces cuando el sedimento esté listo para secar.
Reactivo de cistina (4.4.3):	calentados cuidadosamente, los componentes que contienen cistina (pelo, plumas, etc.) adquieren un color marrón oscuro.

6.4. *Examen de alimentos susceptibles de contener harina de pescado*

Se examinará en el microscopio compuesto al menos una lámina de las fracciones de tamiz y de sedimento de menor granulometría (véanse los puntos 6.1 y 6.2).

En los casos en que la etiqueta indique que los ingredientes incluyen harina de pescado, se sospeche tal presencia o se haya detectado en el examen inicial, se examinarán al menos dos láminas adicionales de la fracción de tamiz de menor granulometría de la muestra original, y se examinará la fracción total de sedimento.

7. **Cálculo y evaluación**

Los Estados miembros velarán por la aplicación de los procedimientos descritos en este punto cuando se realice un análisis oficial para estimar la cantidad (y no sólo la presencia) de componentes de origen animal.

El cálculo sólo puede hacerse si los componentes de origen animal contienen fragmentos óseos.

En las láminas microscópicas, los fragmentos óseos de especies terrestres de sangre caliente (es decir, mamíferos y aves) pueden distinguirse de los diversos tipos de huesos de pescado gracias a sus típicas lagunas. La proporción de componentes de origen animal en la materia de muestra se estima tomando en consideración:

- la proporción estimada (porcentaje en peso) de fragmentos óseos en el sedimento concentrado,
- la proporción (porcentaje en peso) de hueso presente en los componentes de origen animal.

El cálculo debe basarse en al menos tres (si es posible) láminas y al menos cinco campos por lámina. En los piensos compuestos, el sedimento concentrado por regla general contiene no sólo huesos de animal terrestre y fragmentos de hueso de pescado sino también otras partículas del peso específico elevado como, por ejemplo, minerales, arena, fragmentos vegetales lignificados y similares.

7.1. *Valor estimado del porcentaje de fragmentos óseos*

Porcentaje de fragmentos de huesos de animales terrestres = $(S \times c)/W$

Porcentaje de fragmentos de huesos y escamas de pescados = $(S \times d)/W$

[S = peso (mg) del sedimento, c = factor de corrección (%) para la porción estimada de huesos de animales terrestres del sedimento, d = factor de corrección (%) para la porción calculada de fragmentos de huesos y escamas de pescado del sedimento, W = peso de la materia de muestra para la sedimentación (mg)].

7.2. *Valor estimado de los componentes de origen animal*

La proporción de componentes óseos en productos animales puede variar considerablemente. (El porcentaje óseo en el caso de las harinas de huesos es del orden del 50-60 % y en el caso de las harinas de carne del orden del 20-30 %; en el caso de las harinas de pescado el contenido de huesos y escamas varía según la categoría y el origen de la harina, normalmente es del orden del 10-20 %).

Si el tipo de harina animal presente en la muestra es conocido, pueden hacerse la siguientes estimaciones del contenido:

Contenido estimado de componentes de productos de animales terrestres (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Contenido estimado de componentes de productos de pescado (%) = $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

[S = peso (mg) del sedimento, c = factor de corrección (%) para la porción estimada de componentes óseos de animales terrestres del sedimento, d = factor de corrección (%) para la porción estimada de fragmentos de huesos y escamas de pescado del sedimento, f = factor de corrección para la proporción ósea de los componentes de origen animal en la muestra examinada, W = peso del material de muestra para la sedimentación (mg)].

8. **Expresión del resultado del examen**

El informe contendrá al menos los datos sobre la presencia de componentes derivados de animales terrestres y de harina de pescado. Los diversos casos se describirán de la siguiente forma:

8.1. *En cuanto a la presencia de componentes derivados de animales terrestres:*

- En el examen microscópico de la muestra presentada, no se ha detectado ningún componente derivado de animales terrestres.
- En el examen microscópico de la muestra presentada, se han detectado componentes derivados de animales terrestres.

8.2. *En cuanto a la presencia de harina de pescado:*

- En el examen microscópico de la muestra presentada, no se han detectado componentes derivados del pescado.
- En el examen microscópico de la muestra presentada, se han detectado componentes derivados del pescado.

En caso de que se detecten componentes derivados del pescado o de animales terrestres, el informe del resultado del examen puede incluir también, si procede, una estimación de la cantidad de componentes detectada (x %, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % o > 5 %), especificar, si es posible, el tipo de animal terrestre y de los componentes animales identificados (fibras musculares, cartílago, huesos, cuerno, pelo, cerdas, plumas, sangre, cáscaras de huevo, huesos y escamas de pescado).

Si se hace una estimación de la cantidad de ingredientes animales, se indicará el factor de corrección, f, utilizado.

Si se identifican los componentes óseos de animales terrestres, el informe deberá incluir la frase siguiente:

«No puede excluirse la posibilidad de que los componentes mencionados sean originarios de mamíferos.»

La inclusión de esta frase no será necesaria cuando los fragmentos óseos de animales terrestres se identifiquen como originarios de aves de corral o de mamíferos.

9. **Protocolo opcional para el análisis de grasas o aceites**

En el análisis de las grasas y los aceites podrá utilizarse el siguiente protocolo:

- Si la grasa es sólida, deberá calentarse, por ejemplo, en un microondas hasta su fusión.
 - A continuación, se transferirán mediante una pipeta 40 ml de grasa de la base de la muestra a un tubo de centrifugación.
 - Centrifugar durante 10 minutos a 4 000 rpm.
 - Si, tras la centrifugación, la grasa se solidifica, deberá calentarse una vez más en un horno hasta su liquificación. Repetir la centrifugación durante 5 minutos a 4 000 rpm.
 - A continuación se transferirá mediante una cucharilla o una espátula, la mitad de las impurezas decantadas a una pequeña placa de Petri o a una lámina de microscopio, para determinar al microscopio la eventual presencia de componentes de origen animal (fibras de carne, plumas, fragmentos óseos, etc.). Como agente de imbibición para el examen microscópico se recomienda aceite de parafina o glicerol.
 - Las impurezas restantes se utilizarán para la sedimentación descrita en el punto 6.2.
-