

PRZEWODNIK WYKRYWANIA W PASZACH SKŁADNIKÓW PRZETWORZONEGO BIAŁKA ZWIERZĘCEGO I OWADZIEGO METODĄ MIKROSKOPOWĄ

Monografia autorstwa

dr Anna Weiner, prof. dr hab. Krzysztof Kwiatek,

mgr inż. Ilona Paprocka

Projekt badawczy finansowany przez Narodowego Centrum Badań i Rozwoju 2018 – 2021 GOSPOSTRATEG 1/385141/16/NCBR/2018. „Opracowanie strategii wykorzystania alternatywnych źródeł białka owadów w żywieniu zwierząt umożliwiającej rozwój jego produkcji na terytorium RP „OWADY”.

Wykonawcy projektu:

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi – lider projektu

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie – lider finansowy

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Nazwa i adres wydawcy:

Zakład Higieny Pasz

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

al. Partyzantów 57

24-100 Puławy

Druk:

Partner Poligrafia Andrzej Kardasz, ul. Szosa Baranowicka 77, Białystok

Nakład: 100 egzemplarzy

Spis treści:

1. Przetworzone białko pochodzenia zwierzęcego/składniki pochodzenia zwierzęcego – definicja, możliwości wykorzystania i kontroli stosowania	5
2. Metody wykrywania przetworzonego białka zwierzęcego.....	13
2. 1. Metoda mikroskopowa.....	14
2. 2. Metody biologii molekularnej.....	14
2. 3. Metody alternatywne.....	16
3. Uregulowania prawne i wytyczne do metody mikroskopowej.....	17
4. Wykrywanie elementów przetworzonego białka zwierzęcego metodą mikroskopową.....	25
4. 1. Wykrywanie elementów pochodzenia zwierzęcego w osadzie próbki.....	31
4. 2. Identyfikacja składników pochodzenia zwierzęcego we flotacie.....	73
4. 3. Wykrywanie mączek z krwi i produktów z krwi.....	82
4. 4. Identyfikacja cząstek z owadów.....	86
4. 5. Elementy roślinne i mineralne przypominające składniki zwierzęce.....	107
5. Piśmiennictwo.....	119

1. Przetworzone białko pochodzenia zwierzęcego/składniki pochodzenia zwierzęcego – definicja, możliwości wykorzystania i kontroli stosowania.

Produkty uboczne pochodzenia zwierzęcego (UPPZ) jako niejadalne, a czasem również jadalne surowce stanowią źródło pełnowartościowego białka, które może być wykorzystane, po odpowiednim przetworzeniu, jako produkt pochodny do produkcji pasz i żywienia zwierząt gospodarskich. Przetworzone białko pochodzenia zwierzęcego, zgodnie z definicją zawartą w Rozporządzeniu Komisji (UE) Nr 142/2011, oznacza - białko zwierzęce otrzymane całkowicie z materiału kategorii 3, poddane obróbce zgodnie z załącznikiem X rozdział II sekcja 1 (w tym mączkę z krwi i mączkę rybną) w celu uzdatnienia do bezpośredniego zastosowania jako materiał paszowy lub do jakichkolwiek innych zastosowań w paszach, w karmie dla zwierząt domowych, lub do wykorzystania w nawozach organicznych, polepszaczach gleby.

Stały spadek połowów ryb oraz zwiększone zapotrzebowanie na paszę dla zwierząt gospodarskich i akwakultury spowodowało gwałtowne zmniejszenie dostępności mączki rybnej, oleju rybnego przy jednoczesnym wzroście cen tych materiałów. Z tego względu podejmowane są działania na rzecz poszukiwania nowych źródeł białek zwierzęcego pochodzenia. W roku 2017 wydano Rozporządzeniem Komisji (UE) 2017/893 z dnia 24 maja 2017 r. zmieniające załączniki I i IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 oraz załączniki X, XIV, XV do rozporządzenia Komisji (UE) nr 142/2011 w odniesieniu do przepisów dotyczących przetworzonego białka zwierzęcego. Zgodnie z tą nowelizacją dopuszczono do stosowania do celów paszowych przetworzone białko zwierzęce pochodzące od owadów gospodarskich i przeznaczone do produkcji paszy dla zwierząt akwakultury, które uzyskano wyłącznie z następujących gatunków owadów: (i) czarna mucha (*Hermetia illucens*) i mucha domowa (*Musca domestica*); (ii) mącznik młynarek (*Tenebrio molitor*) i pleśniakowiec lśniący (*Alphitobius diaperinus*); (iii) świerszcz domowy (*Acheta domesticus*), świerszcz bananowy (*Gryllodes sigillatus*) i świerszcz kubański (*Gryllus assimilis*). Z przytoczonej definicji wynika, że owady gospodarskie są zwierzętami gospodarskimi, co stwarza nowe wyzwania związane z przestrzeganiem przepisów opracowanych w kontekście tradycyjnie pojmowanych gatunków zwierząt, typowych dla naszego obszaru kulturowego. Dostępne dane piśmiennictwa wskazują, że przetworzone białko (PAP) owadzie stanowić może alternatywne i potencjalnie ważne źródło białka do

wykorzystania w żywieniu zwierząt. Przetworzone białko z owadów charakteryzuje się obecnością łatwo dostępnego źródła białka, lipidów, węglowodanów, niektórych witamin i minerałów, takich jak wapń, żelazo lub cynk. Owady (*Insecta*), jako surowiec do produkcji PAP, są rozpatrywane jako bardzo zróżnicowana grupa zwierząt obecnie już „gospodarskich” należąca do gromady stawonogów (*Arthropoda*).

Zgodnie z podaną definicją do przetworzonego białka zwierzęcego nie należą takie produkty jak: produkty z krwi, mleko, produkty na bazie mleka, produkty pochodne mleka, siary, produkty z siary, osad z centryfug lub separatorów, żelatyna, hydrolizaty białkowe, fosforan diwapniowy, fosforan triwapniowy, jaja i produkty jajeczne, w tym skorupki jaj oraz kolagen.

Produkty uboczne pochodzenia zwierzęcego powstają przede wszystkim podczas uboju zwierząt rzeźnych, a następnie przy przetwórstwie surowców pochodzenia zwierzęcego, na przykład produktów mięsnych czy mlecznych. Ponadto surowce zwierzęce do przetwarzania na cele niejadalne mogą powstawać w postępowaniach związanych z usuwaniem zwierząt padłych oraz podczas zwalczania chorób zakaźnych zwierząt. Niezależnie od pochodzenia, produkty te stanowią potencjalne i rzeczywiste zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt oraz dla środowiska. Przykładami mogą być sytuacje kryzysowe związane z ogniskami grypy, pryszczycy, rozprzestrzenianiem się pasażowalnych encefalopatii gąbczastych, takich jak gąbczasta encefalopatia bydła (Bovine Spongiform Encephalopathy - BSE) czy występowaniem dioksyn w paszach. Stanowią one potwierdzenie, że niewłaściwe postępowanie i stosowanie niektórych produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego może mieć decydujący wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt, bezpieczeństwo łańcucha żywnościowego i paszowego oraz zaufanie konsumentów.

Gąbczaste encefalopatie człowieka i zwierząt (Transmissible Spongiform Encephalopathies - TSE's) stanowią grupę zakaźnych chorób neurodegeneracyjnych, które histopatologicznie charakteryzują się gąbczastym zwyrodnieniem komórek nerwowych mózgowia. Jako czynnik etiologiczny uznaje się prion (PrPSc), który stanowi izoformę białka (PrPC) naturalnie występującego w komórkach nerwowych. Białko PrPSc wykazuje dużą oporność na wysokie temperatury. Po raz pierwszy BSE zostało stwierdzone w Wielkiej Brytanii w listopadzie 1986 r. W Europie od połowy lat 80-tych odnotowano wiele tysięcy takich przypadków choroby BSE u bydła. W wyniku dochodzenia epidemiologicznego przyjęto, że w przypadku populacji bydła angielskiego początki ekspozycji na czynnik BSE przypadają na koniec lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych. Wynika to ze stosowania w przeszłości mniej rygorystycznych procesów technologicznych przy wytwarzaniu mączek

mięсно-kostnych pochodzących z przeżuwaczy zawierających czynnik scrapie owiec, które uznane jest za chorobę endemiczną w Wielkiej Brytanii. Przyczyną szybkiego rozprzestrzeniania się BSE w Wielkiej Brytanii było zatem wprowadzenie do pasz dla bydła na zasadzie recyklingu tkanek pochodzących od przeżuwaczy zakażonych BSE. Mieliśmy więc do czynienia z zakażeniem wewnątrzgatunkowym wywołanym przez „kanibalistyczny” sposób żywienia bydła. Z tego względu wprowadzono odpowiednie środki kontroli. Wdrożenie tych działań spowodowało drastyczny spadek liczby przypadków BSE.

Pierwsze ograniczenie, które dotyczyło stosowania mączek mięсно-kostnych pochodzących od przeżuwaczy w żywieniu bydła, wprowadzono w Wielkiej Brytanii 18 lipca 1988 r. Z początkiem lipca 1994 r. wprowadzono kolejne restrykcje w zakresie karmienia bydła, owiec i kóz mączkami pochodzącymi z przetwarzania tkanek ssaków. Następnie od 2001 r., zgodnie z Rozporządzeniem (WE) Nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 maja 2001 r., ustanawiającym zasady zapobiegania, kontroli i eliminacji pewnych postaci zakaźnego gąbczastego zwyrodnienia mózgu (TSE), wprowadzono ograniczenia stosowania ubocznych produktów pochodzenia zwierzęcego (tzw. „feed ban”). Od czasu kryzysu związanego z BSE regulacje prawne dotyczące zakazu pasz i wykorzystania białek zwierzęcych w paszach ulegają ciągłym zmianom.

W 2002 r. zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1774/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 3 października 2002 r., zastąpionym w 2009 roku przez Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. z 21 października 2009 r., produkty uboczne pochodzenia zwierzęcego oraz produkty pochodne zostały skasyfikowane w trzech kategoriach, na podstawie ocen ryzyka zależnie od stopnia zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt. Zgodnie z wytycznymi produkty uboczne pochodzenia zwierzęcego i produkty pochodne stanowiące wysokie zagrożenie mogą być stosowane wyłącznie poza łańcuchem paszowym, natomiast materiały stanowiące niższe zagrożenie mogą być dozwolone przy zachowaniu bezpiecznych warunków.

Materiały kategorii 1 stanowią największe zagrożenie i muszą zostać zniszczone przez spalanie lub przetworzone w biopaliwo. Oprócz spalania lub konwersji na biopaliwo, materiały kategorii 2 mogą być można wykorzystane jako nawozy organiczne lub polepszacze gleby po specjalnym przetworzeniu. Natomiast do produkcji paszy dla zwierząt gospodarskich, zwierząt futerkowych i karmy dla zwierząt domowych można używać wyłącznie materiału kategorii 3. Dodatkowo uboczne produkty pochodzenia zwierzęcego kategorii 1 i 2 muszą być trwale oznaczone triheptanianem glicerolu (GTH) w celu monitorowania potencjalnego skażenia materiałów kategorii 3 materiałami kategorii 1 lub 2.

W rozporządzeniu (WE) nr 1069/2009 utrzymano również zasadę, zgodnie z którą zwierząt gospodarskich nie należy skarmiać materiałem wysokiego ryzyka ani materiałem pochodzącym ze zwierząt tego samego gatunku. Zakaz recyklingu wewnątrzgatunkowego wynika z koncepcji bariery gatunkowej, która oznacza że przeniesienie zakażenia poza barierę gatunkową jest utrudnione. Zakaz ten ma ogromne znaczenie w procesie znoszenia zakazu paszowego dotyczącego stosowania przetworzonych białek zwierzęcych innych niż przeżuwacze w paszach dla zwierząt innych niż przeżuwacze.

Obecnie obowiązuje Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 56/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r., które zakazuje karmienia przeżuwaczy dziasadowym fosforanem wapnia i trizasadowym fosforanem wapnia pochodzenia zwierzęcego oraz mieszankami paszowymi zawierającymi te produkty. Zgodnie z wyżej wymienionym przepisem prawnym przeżuwacze można karmić następującymi materiałami pochodzenia zwierzęcego, tj.:

- mlekiem i produktami na bazie mleka, produktami pochodnymi mleka,
- siarą oraz produktami z siary,
- jajami i produktami jajecznymi,
- kolagenem i żelatyną pochodzącymi od zwierząt innych niż przeżuwacze,
- hydrolizatami białkowymi pochodzącymi z części zwierząt innych niż przeżuwacze lub ze skór i skórek przeżuwaczy.

Ponadto w żywieniu nieodsadzonych przeżuwaczy można stosować preparaty mlekozastępcze wytworzone z mączki rybnej. W przypadku pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich można stosować w żywieniu następujące produkty pochodzenia zwierzęcego:

- hydrolizaty białkowe pochodzące ze zwierząt innych niż przeżuwacze lub ze skór i skórek przeżuwaczy,
- mączkę rybną,
- dziasadowy fosforan wapnia i trizasadowy fosforan wapnia,
- produkty z krwi pochodzące od zwierząt innych niż przeżuwacze.

W żywieniu zwierząt akwakultury można wykorzystywać przetworzone białka zwierzęce inne niż mączka rybna pochodzące od zwierząt nieprzeżuwających.

Należy dodać, że Rozporządzenie Komisji (WE) nr 142/2010 określa wymagania dla tłuszczu paszowych oraz hydrolizatów białkowych. Zgodnie z wytycznymi zawartość nierozpuszczalnych zanieczyszczeń stałych w tłuszczach paszowych pochodzących z przeżuwaczy nie powinna przekraczać 0,15%, a w odniesieniu do hydrolizatów białkowych pochodzących z przeżuwaczy masa cząsteczkowa nie powinna przekraczać 10 kDa.

Tab. 1. Zestawienie możliwości stosowania materiałów pochodzenia zwierzęcego zgodnie z aktualnie obowiązującymi przepisami.

Rodzaj przetworzonego białka zwierzęcego	Gatunek pochodzenia	Pasze dla			Pasze dla akwakultury	Pasze dla zwierząt mięsożernych	Pasze dla zwierząt towarzyszących
		Przeżuwaczy	Trzody chlewnej	Drobiu			
Mączka z krwi	Przeżuwacze	✗	✗	✗	✗	✓	✓
	Wieprzowa	✗	✗	✗	✓	✓	✓
	Drobiowa	✗	✗	✗	✓	✓	✓
Przetworzone biało zwierzęce (inne niż mączka z krwi i mączka rybna)	Przeżuwacze	✗	✗	✗	✗	✓	✓
	Wieprzowa	✗	✗	✗	✓	✓	✓
	Drobiowa	✗	✗	✗	✓	✓	✓
Mączka z piór	Drobiowa	✗	✗	✗	✓	✓	✓
Tłuszcz	Przeżuwaczy	✓*	✓*	✓*	✓*	✓	✓
	Wieprzowy	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Drobiowy	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Produkty z krwi (hemoglobina, plazma, krew suszona)	Przeżuwaczy	✗	✗	✗	✗	✓	✓
	Wieprzowy	✗	✓	✓	✓	✓	✓
	Drobiowy	✗	✓	✓	✓	✓	✓
Żelatyna	Przeżuwaczy	✗	✗	✗	✗	✓	✓
	Wieprzowy	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Drobiowy	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hydrolizaty białkowe	Przeżuwaczy	✓**	✓**	✓**	✓**	✓	✓
	Wieprzowy	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Drobiowy	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Produkty z mleka		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Jaja, produkty z jaj		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Mączka rybna		✗***	✓	✓	✓	✓	✓
PAP owadzi		✗	✗	✗	✓	✓	✓

✗ – zakazane

✓ – dozwolone

* - zawartość nierozpuszczalnych zanieczyszczeń stałych powinna wynosić poniżej 0,15%

** - masa cząsteczkowa nie powinna przekraczać 10 kDa

*** - zatwierdzone są preparaty mlekozastępcze zawierające mączkę rybną i przeznaczone są wyłącznie dla nieodsadzonych przeżuwaczy

Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (UE) NR 56/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r. zmieniającym załączniki I i IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 ustanawiającego zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych przenośnych gąbczastych encefalopatii ważna zmiana dotyczy żywienia zwierząt gospodarskich materiałami paszowymi pochodzenia roślinnego zanieczyszczonymi nieznaczną ilością elementów kostnych pochodzących z tkanek zwierzęcych. Obecnie możliwe jest skorzystanie z takiego odstępstwa na podstawie przeprowadzonej oceny ryzyka stwierdzającej, że istnieje znikome zagrożenie dla zdrowia zwierząt i ludzi. Ocena ryzyka musi uwzględniać przynajmniej następujące elementy:

- stopień zanieczyszczenia,
- charakter i źródło zanieczyszczenia,
- zamierzone wykorzystanie zanieczyszczonej paszy.

W latach 2010-2015 realizowany był plan przywracania możliwości stosowania w żywieniu zwierząt przetworzonego białka zwierzęcego zgodnie z wytycznymi zawartymi w Komunikacie Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady „Druga mapa drogowa dla TSE. Dokument strategiczny w sprawie pasażowalnych encefalopatii gąbczastych na lata 2010-2015”. Dokument ten został wydany w celu zaprezentowania planowanych zmian pod kątem dostosowywania przepisów prawnych do warunków, w których Unia Europejska jest bliska wyeliminowaniu BSE z populacji bydła. Niemniej jednak nadal konieczne jest stosowanie środków zapobiegawczych i stałe monitorowanie sytuacji na wypadek pojawienia się nowych ognisk BSE lub nowego czynnika wywołującego TSE. Zmiany w przepisach są wprowadzane stopniowo w oparciu o konsultacje naukowe z Europejskim Urzędem ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Ponadto muszą uwzględniać istniejące metody badawcze wykorzystywane do kontroli stosowania przetworzonych białek zwierzęcych. Ponowne wprowadzanie do żywienia zwierząt gospodarskich mączek mięsno-kostnych będzie odbywać się poprzez stopniowe uchylanie zakazu paszowego w odniesieniu do zwierząt innych niż przeżuwacze tj. świnie, drób czy ryby. Ze względu na fakt, że ryzyko przeniesienia BSE między zwierzętami nieprzeżuwającymi jest minimalne planowane jest uchylenie zakazu w odniesieniu do stosowania w paszach dla zwierząt nieprzeżuwających przetworzonego białka zwierzęcego pochodzącego od zwierząt innych niż przeżuwacze. Jednak należy zwrócić uwagę, że nadal obowiązywałby zakaz powtórnego przetwarzania wewnątrzgatunkowego, czyli np. PAP drobiowy mogłaby być podawany wyłącznie świnom. Możliwe byłoby to jedynie w

przypadku dostępności zwalidowanych technik analitycznych w zakresie identyfikacji pochodzenia gatunkowego przetworzonego białka zwierzęcego, takie jak: metoda mikroskopowa czy metoda oparta na technice PCR (real-time PCR lub konwencjonalny PCR).

Pomimo stopniowego znoszenia zakazu stosowania przetworzonego białka zwierzęcego w produkcji pasz i żywieniu zwierząt gospodarskich istnieje możliwość wtórnego zanieczyszczenia lub celowego dodania tego rodzaju białka do pasz. Zgodnie z obowiązującymi przepisami w ramach urzędowej kontroli Inspekcja Weterynaryjna zobowiązana jest prowadzić stałą i systematyczną kontrolę przestrzegania zakazu stosowania mączek mięsno-kostnych w produkcji pasz i żywieniu zwierząt gospodarskich. Kontrola obejmuje wszystkie rodzaje pasz na kolejnych etapach produkcji, przetwarzania, przechowywania, transportu oraz stosowania w żywieniu. Do kontroli przestrzegania zakazu wprowadzono metody wykrywania przetworzonego białka zwierzęcego.

Nadzór nad wytwarzaniem i stosowaniem pasz, a także nad ich obrotem, z zastrzeżeniem art. 33 ust. 2 ustawy o paszach sprawuje Inspekcja Weterynaryjna. Powiatowi Lekarze Weterynarii prowadzą kontrolę urzędową obejmującą między innymi badania laboratoryjne obecności i identyfikacji gatunkowej przetworzonego białka zwierzęcego. W zakresie nadzoru nad wytwarzaniem, obrotem i stosowaniem pasz, sprawowanego przez Inspekcję Weterynaryjną działają regionalne laboratoria urzędowe (ZHW) i krajowe laboratorium referencyjne. Zadaniem laboratoriów urzędowych jest prowadzenie rutynowych badań próbek pasz pobranych przez organa Inspekcji Weterynaryjnej. Natomiast do zadań krajowych laboratoriów referencyjnych należy przede wszystkim ujednolicanie standardów i metod analitycznych, organizacja okresowych testów porównawczych poszczególnych metod analitycznych, sprawdzanie metod analitycznych, prowadzenie szkoleń pracowników uprawnionych laboratoriów urzędowych, wykonywanie badań mających na celu potwierdzenie wyników badań przeprowadzonych przez upoważnione laboratoria, w szczególności, jeżeli zachodzi wątpliwość, co do wiarygodności otrzymanych wyników.

Programy urzędowych badań kontrolnych pasz są opracowywane, zatwierdzane, a następnie przekazywane do wdrożenia we wszystkich państwach członkowskich Unii Europejskiej. Opierają się na wynikach badań kontrolnych z lat ubiegłych oraz uwzględniają aktualne problemy występujące w sektorze produkcji i stosowania pasz. W szczególności kontroli podlega przestrzeganie ograniczeń w zakresie stosowania przetworzonego białka zwierzęcego w żywieniu zwierząt gospodarskich. Programem monitoringu objęte są zakłady produkcyjne, punkty kontroli granicznej, gospodarstwa hodowlane, dystrybutorzy, środki

transportu. W Polsce realizację kompleksowego planu urzędowej kontroli przeprowadza się zgodnie z nowelizowanym corocznie Planem Urzędowej Kontroli Pasz (PUKP).

Od 2006 r. podstawą do realizacji tego zadania stało się rozporządzenie 882/2004/WE, które zostało znowelizowane rozporządzeniem (EU) nr 2017/625. W świetle obowiązujących przepisów każde państwo członkowskie Unii Europejskiej zobowiązane jest do opracowania jednego, spójnego programu kontrolnego, niezależnie od struktury organizacyjnej i ilości służb nadzoru funkcjonujących w danym kraju. Przygotowany przez Polskę krajowy plan kontroli urzędowej pasz obejmuje zakres nadzoru sprawowanego przez Inspekcję Weterynaryjną (IW) zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa.

Wyniki tych inspekcji i badań są raportowane w sprawozdaniu z realizacji nadzoru nad paszami, które każde państwo członkowskie Unii Europejskiej jest zobowiązane przedstawić Komisji Europejskiej zgodnie z obowiązującym w tym zakresie wymaganiami. Raporty służą ocenie stanu bezpieczeństwa pasz na obszarze Unii Europejskiej.

2. Metody wykrywania przetworzonego białka zwierzęcego (składników pochodzenia zwierzęcego).

Składniki organiczne i mineralne obecne w produktach przetworzonych wyprodukowanych z UPPZ kategorii 3, które określamy jako przetworzone białko zwierzęce (PAP) są bardzo różnorodne, i obejmują następujące struktury: elementy kostne, chrząstki, mięśnie, łuski, skrzela, otolity, włosy, pióra, rogi, racice, składniki krwi. Terminem tym określa się również PAP uzyskany z przetworzenia owadów gospodarskich, charakteryzujące się specyficznymi strukturami (oskórek, tchawki, włókna mięśniowe) w obrazie mikroskopowym, które przedstawiono w niniejszym przewodniku. Warto podkreślić, że w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 152/2009 ustanowiono metody badawcze stosowane w celu wspierania kontroli urzędowych w celu egzekwowania zakazu stosowania przetworzonego białka zwierzęcego w paszy dla zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność. Do metod tych należą procedury analizy dotyczące oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz, które opisano w załączniku VI do tego rozporządzenia i które przeprowadza się przy pomocy mikroskopii świetlnej lub łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Należy dodać, że wysokie temperatury i czas przetwarzania UPPZ stosowane w procesach technologicznych (minimum 133°C, 3 bary ciśnienia przez 20 min.) wpływają niszcząco na strukturę tkanek, degenerację DNA przez co utrudniają identyfikację. Ponadto w paszach mogą występować dozwolone produkty pochodzenia zwierzęcego, tj. produkty z krwi, mleko, produkty na bazie mleka, produkty pochodne mleka, siary, produkty z siary, żelatyna, hydrolizaty białkowe, fosforany diwapniowy i triwapniowy, jaja i produkty jajeczne, które stanowią przeszkodę w interpretacji wyników wykonywanych badań laboratoryjnych.

Jak podano wcześniej w celu kontroli obecności niedozwolonych produktów pochodzenia zwierzęcego w paszach opracowano metody analityczne, które opisano w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 152/2009. Do 2013 roku kontrola urzędowa była prowadzona tylko z zastosowaniem metody mikroskopowej. Po wprowadzeniu do żywienia przetworzonych białek zwierzęcych innych niż przeżuwacze dodano reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) do identyfikacji DNA przeżuwaczy (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 51/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r.). Poniżej opisano metody stosowane w kontroli urzędowej oraz metody uzupełniające, które być może będą wdrożone wraz z rozszerzaniem możliwości stosowania PAP w żywieniu zwierząt.

2. 1. Metoda mikroskopowa.

Metoda mikroskopowa zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi jest metodą referencyjną w zakresie wykrywania składników pochodzenia zwierzęcego, w tym także tych określanych jako PAP. Polega na wykrywaniu typowych i możliwych do zidentyfikowania cech charakterystycznych składników pochodzenia zwierzęcego takich jak: kości, włosy, pióra, ości, łuski, skrzela. Badanie wykonywane jest zgodnie z załącznikiem VI do Rozporządzenia Komisji (WE) nr 152/2009 i zmienionego przez Rozporządzenie Komisji (Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r., załącznik VI zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 51/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r. oraz Rozporządzeniem wykonawczym Komisji (UE) 2020/1560 z dnia 26 października 2020 r.).

Warto podkreślić, że metoda mikroskopowa jest stosunkowo tania, prosta technicznie, niewrażliwa na wpływ działania wysokich temperatur podczas obróbki termicznej składników pochodzenia zwierzęcego bardzo czułą z granicą wykrywalności na poziomie 0,1%, w zależności od badanej matrycy i rodzaju PAP. Niestety metoda ta ma także wiele wad, wśród których należy wymienić pracochłonność oraz czasochłonność, gdyż dokładne zbadanie jednej próbki wymaga niekiedy ok. 1-2 godzin. Ponadto jest metodą subiektywną, ponieważ poziom wykrywalności składników pochodzenia zwierzęcego w znacznym stopniu zależy od wiedzy i doświadczenia analityka. Nie pozwala na określenie gatunku pochodzenia wykrytych elementów zwierzęcych. Możliwe jest jedynie odróżnienie kości pochodzących od zwierząt lądowych od ości ryb. Stwierdzane włókna mięśniowe nie mogą być przypisane do gatunku.

Pomimo wspomnianych mankamentów, dotychczasowe wyniki pokazują, że metoda mikroskopowa charakteryzuje się bardzo dużą specyficznością, gdyż otrzymuje się najmniej wyników niepoprawnych i może być wykorzystana do badania różnych matryc, na coraz wyższym poziomie zaawansowania i przydatności naukowej i praktycznej. Widoczne jest to w aktach prawa paszowego EU dotyczących jej zastosowania do wykrywania składników pochodzenia zwierząt kręgowych i ryb oraz ostatnio owadów.

2. 2. Metody biologii molekularnej.

Ograniczenia metody mikroskopowej w zakresie identyfikacji gatunku oraz planowane częściowe złagodzenie zakazu paszowego dotyczące możliwości stosowania PAP pochodzącego od innych gatunków niż przeżuwacze spowodowało konieczność opracowania metod analitycznych umożliwiających odróżnienie PAP pochodzącego od przeżuwaczy od PAP wyprodukowanego z innych zwierząt. W tym zakresie wykorzystano metody biologii molekularnej: reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR - ang. Polymerase Chain Reaction)

oparta na amplifikacji DNA (kwas deoksyrybonukleinowy) oraz real-time PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym). Metody te pozwalają na określenie grupy taksonomicznej składników pochodzenia zwierzęcego obecnych w paszach oraz materiałach paszowych. W reakcji PCR, przy użyciu właściwych starterów, można wykryć specyficzną gatunkowo sekwencję DNA. W pracowni przetworzonego białka pochodzenia zwierzęcego Zakładu Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego (PIWet-PIB) został opracowany i wdrożony test PCR do wykrywania dodatku przetworzonego białka przeżuwaczy, wołowego, owczego, drobiowego i trzody chlewnej w paszach. Osiągnięto poziomy wykrywalności: 0,05% dla DNA białka przeżuwaczy, wołowego i owczego, 0,1% dla DNA białka wieprzowego i 0,2% dla DNA białka drobiowego.

Procedury identyfikacji DNA białka przeżuwaczy, wieprzowego i drobiowego z zastosowaniem techniki real-time PCR zostały opracowane przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. białek zwierzęcych (EURL-AP). Dotychczas tylko metoda identyfikacji DNA przeżuwaczy jest częścią oficjalnej metody zawartej w załączniku VI Rozporządzenia Komisji 152/2009. Wykorzystywana jest w badaniach pasz i materiałów paszowych przeznaczonych dla zwierząt akwakultury. Metoda real-time PCR identyfikacji DNA przeżuwaczy charakteryzuje się wysoką czułością, osiąga granicę wykrywalności na poziomie 0,05%.

Niestety metody PCR, zarówno konwencjonalny jak i w czasie rzeczywistym, ma pewne ograniczenia ze względu na degradację DNA podczas obróbki termicznej stosowanej w produkcji PAP. Dopiero wykorzystanie w badaniach mitochondrialnego DNA (mDNA) oraz krótkiego docelowego fragmentu DNA pozwoliło na możliwość zastosowania metod PCR i real-time PCR w badaniach PAP. Mitochondrialne DNA jest bardziej odporne na degradację pod wpływem wysokich temperatur ze względu na kolistą budowę oraz wysoką wydajnością ekstrakcji nawet z niewielkich ilości materiału biologicznego.

W przypadku przetworzonych białek zwierzęcych, które poddawane są działaniom temperatury powyżej 133°C następuje zmniejszenie liczby kopii DNA, ponadto ulega ono degradacji na małe fragmenty. Największe zmniejszenie liczby kopii DNA stwierdzono w zakresie temperatur od 135°C do 138°C. Dodatkowo zaobserwowano, że liczba kopii DNA materiału ogrzewanego w temperaturze 130°C była około 140 razy większa niż w przypadku materiału poddanego działaniu temperatury. Z tego względu w tym badaniu uzyskano krótką długość fragmentów DNA (86-149 pz), które stosuje się w metodach identyfikacji gatunków mączki mięsno-kostnej i PAP. Metody PCR dostarczają informacji o pochodzeniu

genetycznym DNA obecnego w paszy, np. DNA przeżuwaczy, ale nie są w stanie odróżnić komórkowego pochodzenia danego sygnału (np. leukocytów, miocytów czy osteocytów). Z tego powodu metoda nie pozwala na rozróżnienie między dozwolonym a zakazanym materiałem pochodzącym z danego gatunku, np. dozwolonym mlekiem a zakazaną mączką mięsno-kostną.

Połączenie zdolności do rozróżniania tkanek metody mikroskopowej i identyfikacji gatunku metody real-time PCR pozwoliło na ponowne wprowadzenie PAP innego niż przeżuwaczy do żywienia zwierząt akwakultury, przy jednoczesnym zapewnieniu bezpieczeństwa paszy. Jednak aby w przyszłości ponownie możliwe było stosowanie PAP innych niż przeżuwacze w paszach dla innych zwierząt niż przeżuwacze, konieczne jest opracowanie metod pozwalających na odróżnienie produktów dopuszczonych od zakazanych. Z tego względu konieczne jest opracowanie i wdrożenie metod uzupełniających.

2.3. Metody alternatywne

Od początku wprowadzenia zakazu stosowania PAP w żywieniu zwierząt podejmowane są próby opracowania innych metod analitycznych umożliwiających wykrywanie i identyfikację gatunkową składników pochodzenia zwierzęcego. W badaniach wykorzystywano metody spektroskopowe, immunoenzymatyczne, spektrometryczne, które w dalszym ciągu są przedmiotem badań i doskonalenia.

3. Uregulowania prawne i wytyczne do metody mikroskopowej.

Metodyka badania mikroskopowego, opisana po raz pierwszy w Dyrektywie Rady 98/88/EC z dnia 13 listopada 1998 r., została dopuszczona do stosowania w krajach WE jako metoda rutynowa do wykrywania przetworzonego białka zwierzęcego w paszach. Na podstawie wspomnianej Dyrektywy, w Zakładzie Higieny Pasz PIWet-PIB opracowano Instrukcję Laboratoryjną Głównego Lekarza Weterynarii „Wykrywanie obecności i identyfikacja gatunkowa przetworzonego białka zwierzęcego w środkach żywienia zwierząt”. Następnie wytyczne dotyczące wykrywania przetworzonego białka zwierzęcego w paszach zostały zawarte w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 stycznia 2003 r. w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, prefiksach i mieszankach paszowych.

Od 2003 roku obowiązywała metodyka opisana w Dyrektywą Komisji nr 2003/126/EC z dnia 23 grudnia 2003 r. Z kolei wytyczne zawarte w wymienionej Dyrektywie były podstawą do opisanie metody w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 2 grudnia 2004 r. w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych, a następnie w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 6 marca 2006 r. w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych oraz w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 czerwca 2007 r. w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych. W 2009 r. wytyczne metody mikroskopowego wykrywania przetworzonego białka zwierzęcego zostały zawarte w Rozporządzeniu Komisji (WE) Nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiającym metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz. Kolejna nowelizacja miała miejsce w 2013 roku wraz z Rozporządzeniem Komisji (UE) Nr 51/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r. zmieniającym rozporządzenie (WE) Nr 152/2009 w odniesieniu do metod analitycznych oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz. Obecnie obowiązuje Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2020/1560 z dnia 26 października 2020 r. zmieniające załącznik VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009

ustanawiający metody analizy dotyczące oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. U. L 357/17 z dn. 27.10.2020).

Do badań wykorzystywana jest reprezentatywna próbka, pobrana zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) Nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiającym metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz.

W laboratorium należy przygotować 50g próbki. Pasze ziarniste i granulowane wstępnie należy przesiać przez sito o oczkach 1 mm, a następnie uzyskane frakcje należy traktować jako odrębne próbki.

Próbkę należy rozdrobnić w młynku. Z próbki należy pobrać podpróbę o masie 10 g, a w przypadku mączki rybnej lub innych czystych produktów zwierzęcych, składników mineralnych lub premiksów, które wytwarzają więcej niż 10 % osadu – 3g. Następnie porcję podpróbki należy umieścić w rozdzielaczu lub zlewce i dodać 50 ml tetrachloroetyleny (Fot. 1).



Fot. 1. Widok mieszaniny próbki i tetrachloroetyleny podczas sedymentacji

Mieszaniną należy wstrząsać przez 30 s i następnie dodać kolejne 50 ml tetrachloroetyleny, zmywając wewnętrzną powierzchnię rozdzielacza, aby usunąć wszelkie przylegające cząstki. Następnie otrzymaną mieszaninę należy pozostawić na 5 min.

W przypadku użycia zlewki mieszaninę należy mieszać przez 15 s, a wszelkie cząstki przylegające do ścianek zlewki ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując 10 ml tetrachloroetyleny. Mieszaninę należy pozostawić na 3 min, a następnie mieszać ponownie przez 15 s, a wszelkie cząstki przylegające do ścianek zlewki należy ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując 10 ml tetrachloroetyleny. Otrzymaną mieszaninę należy pozostawić na 5 min.

W przypadku użycia rozdzielacza osad należy zebrać na bibule filtracyjnej umieszczonej w lejku, aby oddzielić pozostały tetrachloroetylen. Natomiast gdy rozdział próbki wykonywany przy użyciu zlewki należy usunąć płynną frakcję poprzez staranną dekantację. Podczas tej czynności należy uważać, aby nie utracić części osadu. Następnie należy przenieść flotat i osad suszyć pod wyciągiem (Fot. 2, 3). Jeżeli cząstki osadu są zróżnicowanej wielkości należy osad przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje.

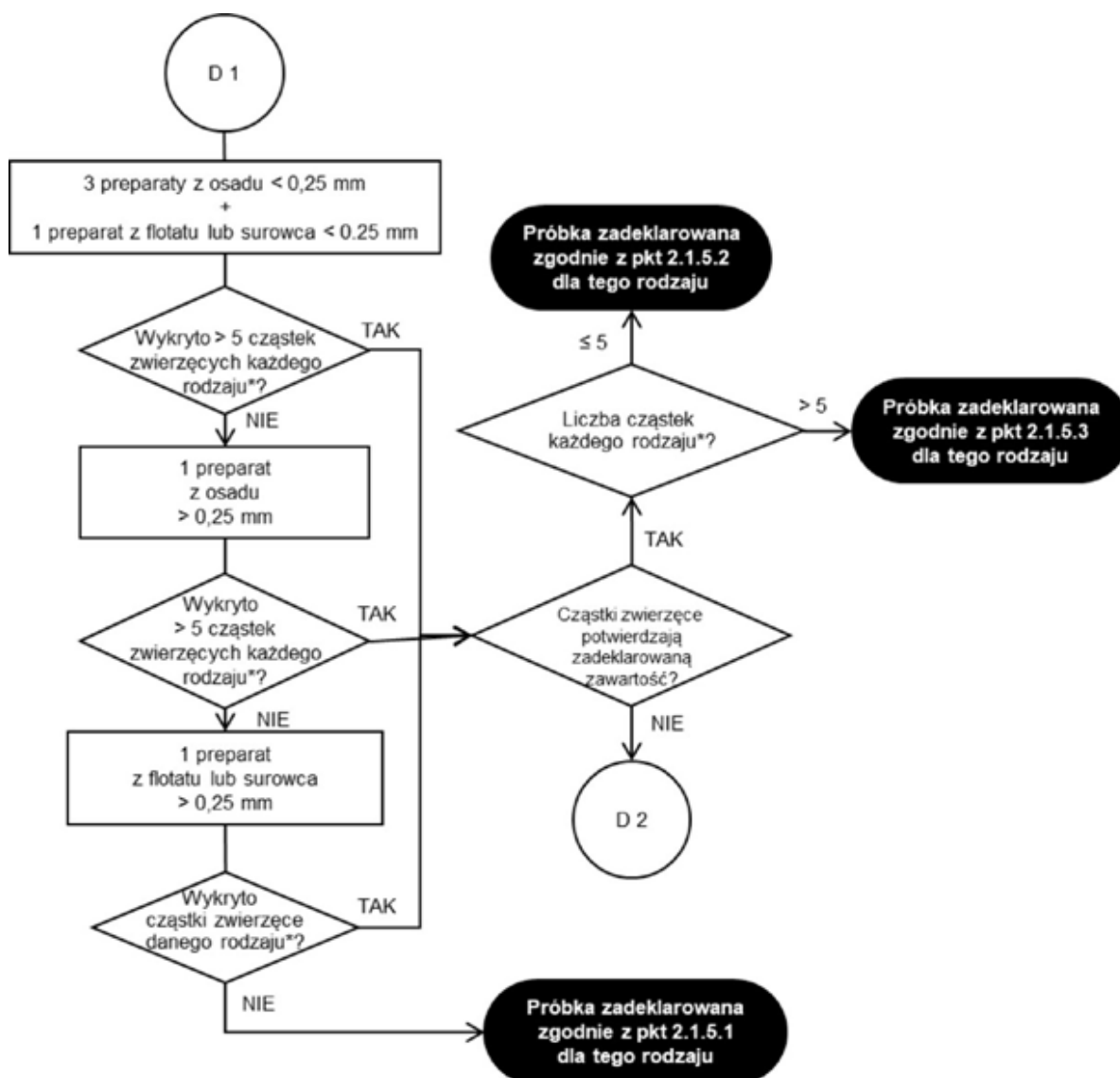


Fot. 2. Widok flotatu i osadu przeniesionego ze zlewki na płytki Petriego.



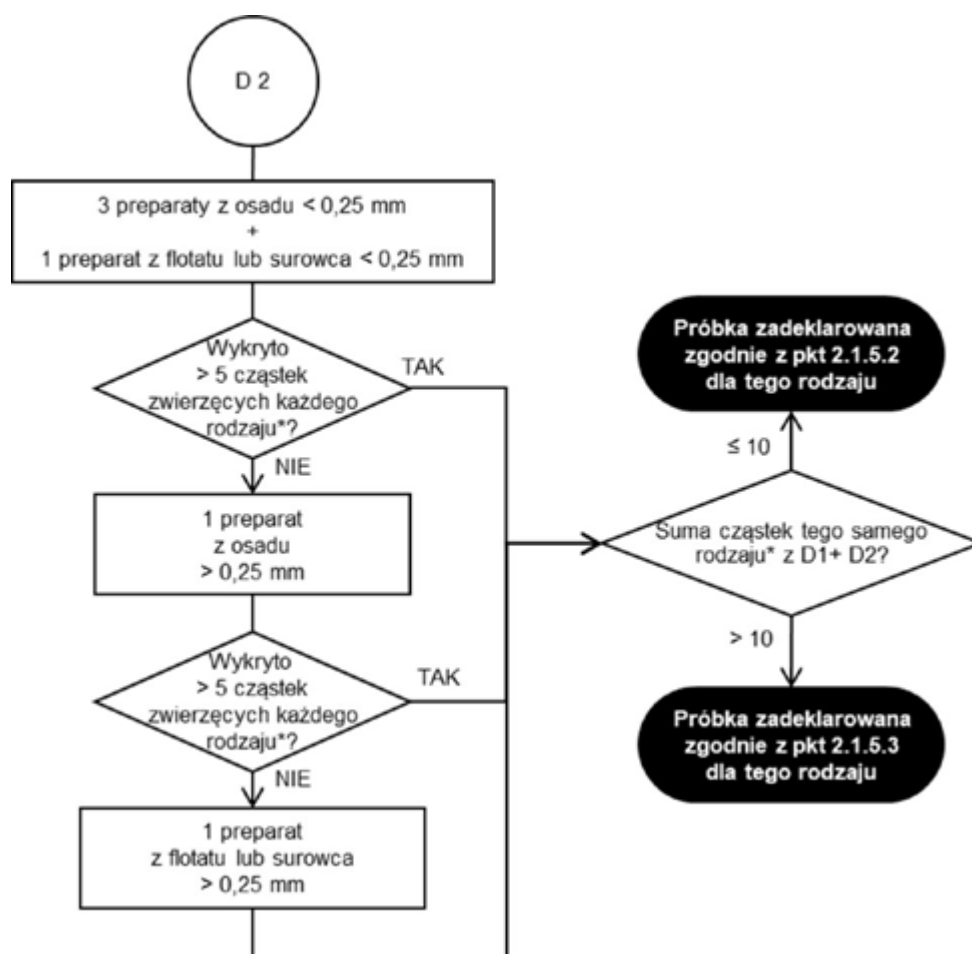
Fot. 3. Widok flotatu i osadu przeniesionego z rozdzielacza.

Preparaty do obserwacji mikroskopowych przygotowuje się z osadu oraz z flotatu lub surowca, zależnie od wyboru analityka. W przypadku frakcji gruboziarnistych można wykorzystać do badania mikroskop stereoskopowy. Preparaty należy przeglądać w całości, przy zastosowaniu różnych powiększeń. Badanie należy wykonać zgodnie z diagramem obserwacji, który obejmuje schemat 1 i 2. Podczas badania należy przestrzegać minimalnej liczby preparatów, które należy poddać obserwacji. Jedynie w przypadku, gdy cały materiał poddany rozdziałowi na frakcje jest niewystarczający, możliwe jest wykonanie obserwacji w takiej ilości ile jest uzyskanego materiału. Należy obserwować nie więcej niż 6 preparatów na jedno oznaczenie.



Schemat nr 1. Diagram obserwacji do wykrycia cząstek zwierzęcych w mieszankach paszowych.

W celu ułatwienia poprawnej identyfikacji składników pochodzenia zwierzęcego, podczas przygotowania próbki laborant może używać odczynników osadzających, tj.: glicerol, olej parafinowy oraz odczynników barwiących, np.: odczynnik cystynowy, roztwór jodu w jodku potasu, czerwień alizarynowa. W przypadku wykrywania mącek z krwi i produktów z krwi, np. hemoglobina można zastosować mieszaninę tetrametylbenzydyny i nadtlenu wodoru.



Schemat nr 2. Diagram obserwacji w celu wykrycia cząstek zwierzęcych w mieszankach paszowych i materiałach paszowych podczas drugiego oznaczenia.

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia, wykonanego zgodnie z diagramem obserwacji, nie wykryto żadnego elementu pochodzenia zwierzęcego, nie jest konieczne wykonanie kolejnego oznaczenia. Wynik badania jest ujemny.

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia, wykonanego zgodnie z diagramem obserwacji, wykryto cząstki zwierzęce danego rodzaju (kręgowce lądowe lub ryby) zgodnie z deklarowaną zawartością próbki, drugie oznaczenie nie jest konieczne. Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia wykryto >5 fragmentów zwierzęcych danego rodzaju (tj. zwierzęcia lądowego lub ryby) to wynik badania jest dodatni. Wynik przedstawiany jest zależnie od ilości stwierdzonych cząstek, powyżej 5 lub ≤ 5 . Wynik analizy musi zawierać rodzaj zwierzęcia (kręgowce lądowe lub ryby).

Powtórne oznaczenie jest konieczne, jeśli stwierdzono obecność elementów pochodzenia zwierzęcego a do laboratorium nie dostarczono deklaracji zawartości lub w pierwszym oznaczeniu ilość stwierdzanych fragmentów zwierzęcych danego rodzaju (tj. zwierzęcia lądowego lub ryby) wynosi ≤ 5 .

Jeżeli w drugim oznaczeniu suma stwierdzanych fragmentów pochodzenia zwierzęcego danego rodzaju wykrytych podczas dwóch oznaczeń wynosi powyżej 10, wówczas wynik badania przedstawiany jest jako dodatni. Jeśli łączna ilość stwierdzanych fragmentów wynosi ≤ 10 podczas dwóch oznaczeń wówczas stosowana jest odpowiednia formuła wyniku. Wynik analizy musi zawierać rodzaj zwierzęcia (kręgowce lądowe lub ryby).

Wynik badania jest wyrażany odpowiednio dla poszczególnych przypadków.

- Nie wykryto żadnych fragmentów zwierzęcych danego rodzaju.

Nie stwierdzono obecności składników charakterystycznych dla zwierząt lądowych i ryb.

- Po wykonaniu tylko jednego oznaczenia wykryto od 1 do 5 fragmentów zwierzęcych danego rodzaju.

W badanej próbce stwierdzono obecność nie więcej niż 5 elementów pochodzących z kręgowców lądowych. Zaznacza się jakie składniki charakterystyczne zaobserwowano dla mączek rybnych (ości rybie, łuski, skrzela) lub dla kręgowców lądowych (fragmenty kości, piór, włosów). Ta niewielka ilość jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla metody mikroskopowej.

- Po wykonaniu tylko jednego oznaczenia wykryto powyżej 5 fragmentów zwierzęcych danego rodzaju.

W badanej próbce stwierdzono obecność więcej niż 5 elementów pochodzących z kręgowców lądowych. Zaznacza się jakie składniki charakterystyczne zaobserwowano dla mączek rybnych (ości rybie, łuski, skrzela) lub dla kręgowców lądowych (fragmenty kości, piór, włosów).

- Po wykonaniu dwóch oznaczeń wykryto od 1 do 10 fragmentów zwierzęcych danego rodzaju.

W badanej próbce stwierdzono obecność nie więcej niż 10 elementów pochodzących z kręgowców lądowych. Zaznacza się jakie składniki charakterystyczne zaobserwowano dla mączek rybnych (ości rybie, łuski, skrzela) lub dla kręgowców lądowych (fragmenty kości, piór, włosów). Ta niewielka ilość jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla metody mikroskopowej.

- Po wykonaniu dwóch oznaczeń wykryto powyżej 10 fragmentów zwierzęcych danego rodzaju.

W badanej próbce stwierdzono obecność więcej niż 10 elementów pochodzących z kręgowców lądowych. Zaznacza się jakie składniki charakterystyczne zaobserwowano dla

mączek rybnych (ości rybie, łuski, skrzela) lub dla kręgowców lądowych (fragmenty kości, piór, włosów).

Dodatkowo, w przypadku wstępnego przesiewu próbki w sprawozdaniu należy określić w jakiej frakcji (sitowej, granulowanej, ziarnistej) wykryto cząstki zwierzęce: „Cząstki zwierzęce stwierdzono we frakcji sitowej/granulowanej/ziarnistej”. Obecność cząstek zwierzęcych tylko we frakcji sitowej może świadczyć o zanieczyszczeniu środowiskowym.

W przypadku stwierdzenia cząstek zwierzęcych, których nie można klasyfikować jako kręgowce lądowe lub ryby, np. włókna mięśniowe, w sprawozdaniu należy wymienić takie fragmenty zwierzęce i umieścić uwagę: „Nie można wykluczyć, że pochodzą od kręgowców lądowych”.

W odniesieniu do wykrywania produktów z krwi formuła wyniku brzmi: „stwierdzono/nie stwierdzono obecność produktów z krwi”

W laboratoriach urzędowych badających pasze w kierunku wykrywania obecności przetworzonego białka pochodzenia zwierzęcego stosuje się w badaniach przesiewowych i odwoławczych metodę mikroskopową. PIWet-PIB w Puławach sprawuje nadzór nad jakością badań wykonywanych w Zakładach Higieny Weterynaryjnej oraz przeprowadza badania laboratoryjne niezbędne do rozpatrzenia odwołania od decyzji organu Inspekcji Weterynaryjnej.



Fot. 4. Pracownia przetworzonego białka zwierzęcego.

Modyfikacja metody mikroskopowej do wykrywania elementów pochodzących z owadów

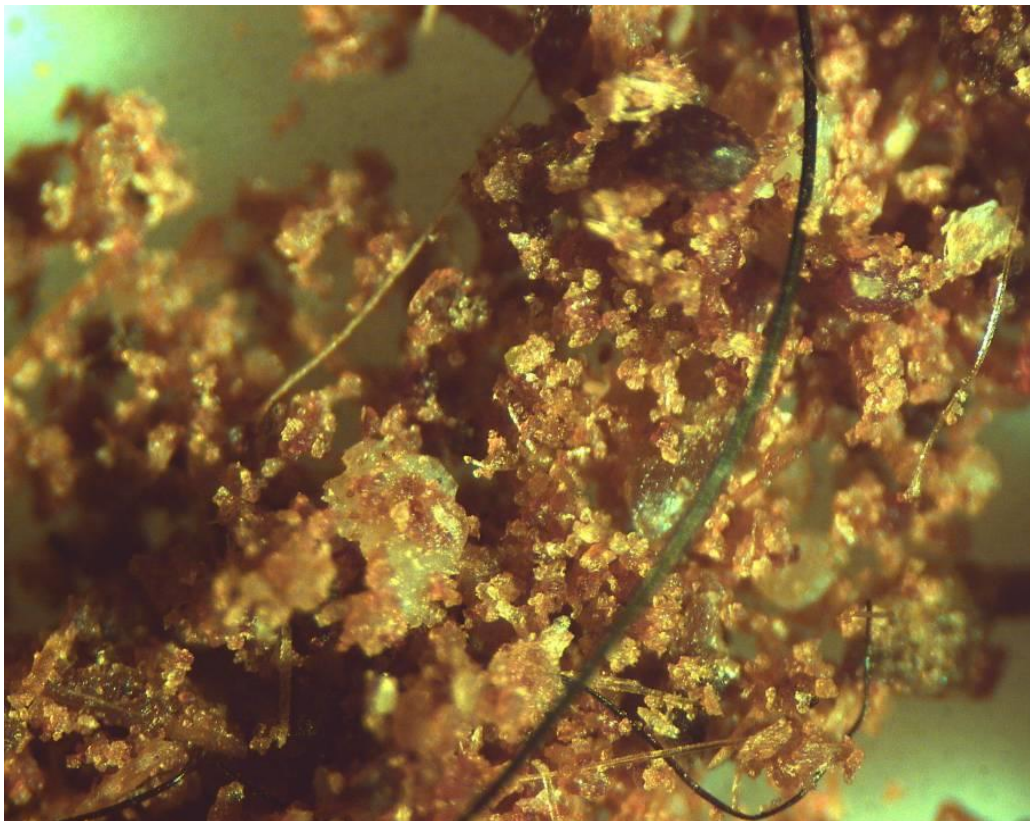
Wprowadzenie do żywienia ograniczonej grupy zwierząt, akwakultury, przetworzonych białek pochodzących z owadów przyczyniło się do poszukiwania metody pozwalającej na wykrycie takich składników w paszy. Metoda mikroskopowa, ze względu na swoje zalety a także jako powszechnie stosowana w laboratoriach, została jako pierwsza zaadoptowana do wykrywania elementów pochodzących owadów.

Elementy pochodzące z owadów, pozbawione elementów kostnych, po sedymentacji próbki znajdują się we flotacie. W celu ułatwienia ich wykrycia zmieniono proces rozdziału próbki. Wykonywana jest podwójna sedymentacja. Po przeprowadzeniu rozdziału próbki w

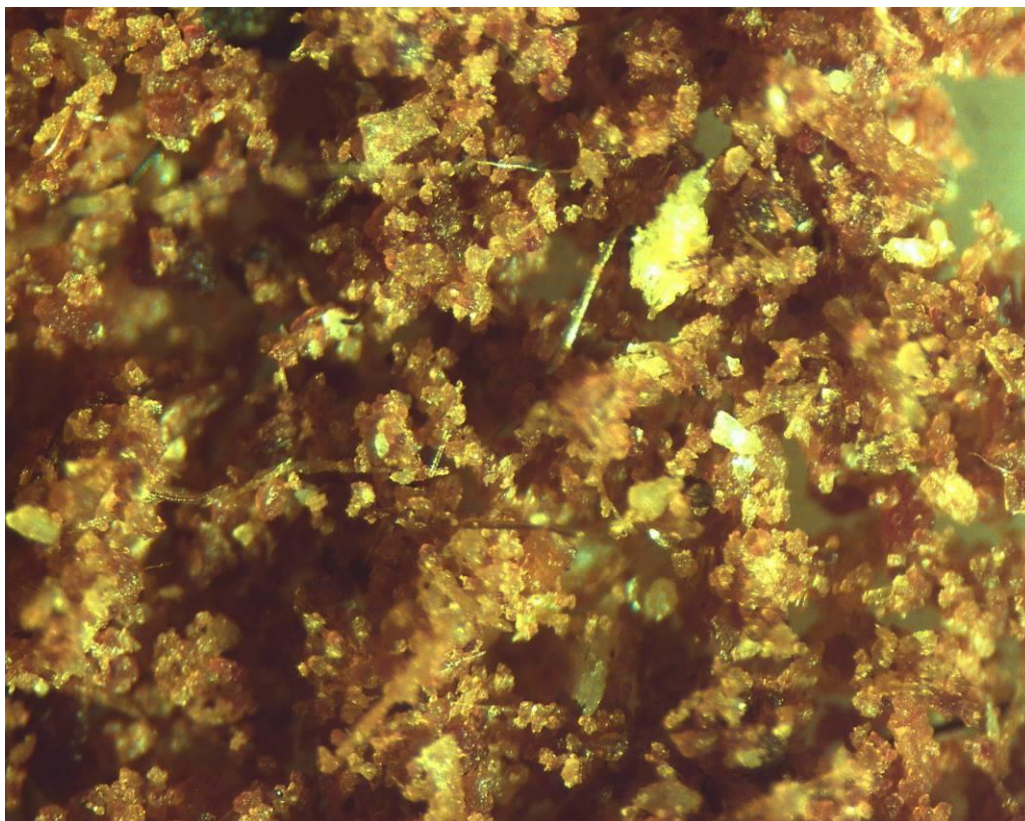
rozdzielaczu zgodnie z wytycznymi w Rozporządzeniu, należy zebrać osad. Następnie należy zlać ok. 30 ml tetrachloroetyleny i dodać do rozdzielacza 30 ml eteru naftowego. W kolejnym etapie należy dokładnie wymieszać zawartość rozdzielacza. Powstają dwie frakcje: flotat I i flotat II, które należy oddzielnie przenieść na płytki Petriego i wysuszyć. Elementy pochodzące z owadów można stwierdzić we flotacie II. Szczegółowy opis metody jest przedmiotem nowelizacji dotychczas obowiązującego Rozporządzenie wykonawczego Komisji (UE) 2020/1560 z dnia 26 października 2020 r. zmieniające załącznik VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 ustanawiający metody analizy dotyczące oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz.

4. Wykrywanie elementów przetworzonego białka zwierzęcego metodą mikroskopową.

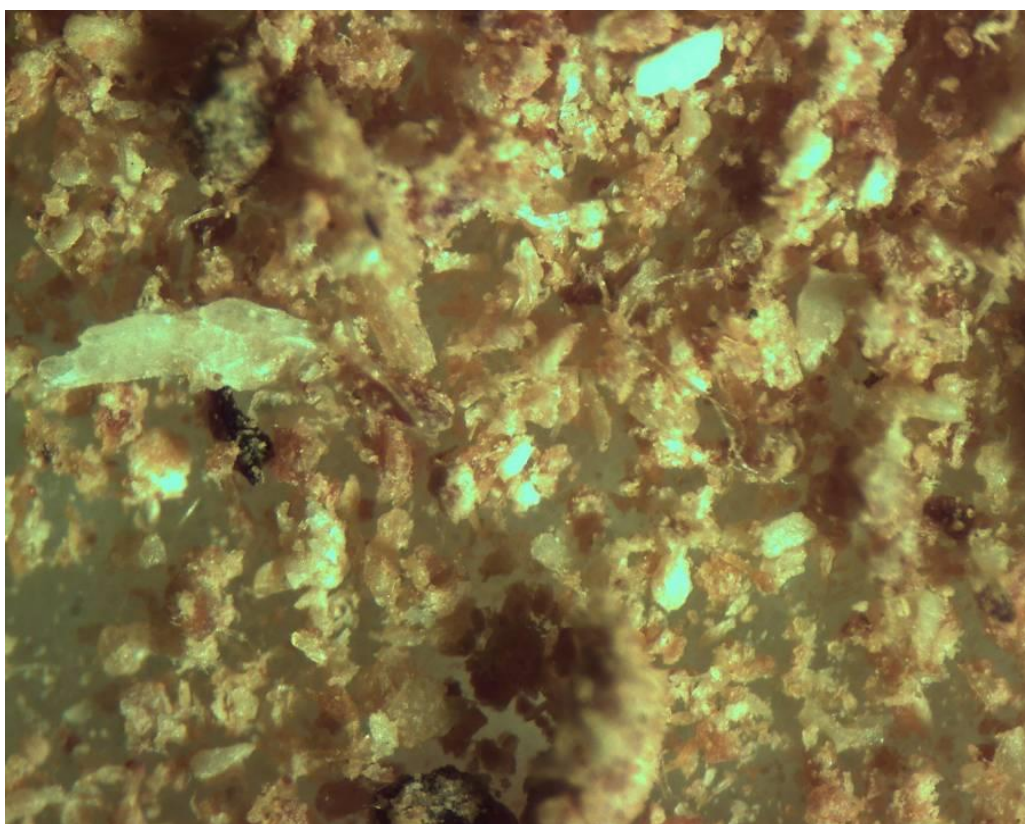
Badanie polega na przeglądaniu próbek paszy przy użyciu mikroskopu w poszukiwaniu składników pochodzenia zwierzęcego, które są identyfikowane na podstawie charakterystycznych cech morfologicznych tkanek zwierzęcych, tj.: kości, włosy, pióra, szczecina, ości ryb, łuski, skrzela, chrząstki, włókna mięśniowe i inne cząstki tkanki mięśniowej, skorupy jaj, krwi, globulek mleka, kryształów laktozy.



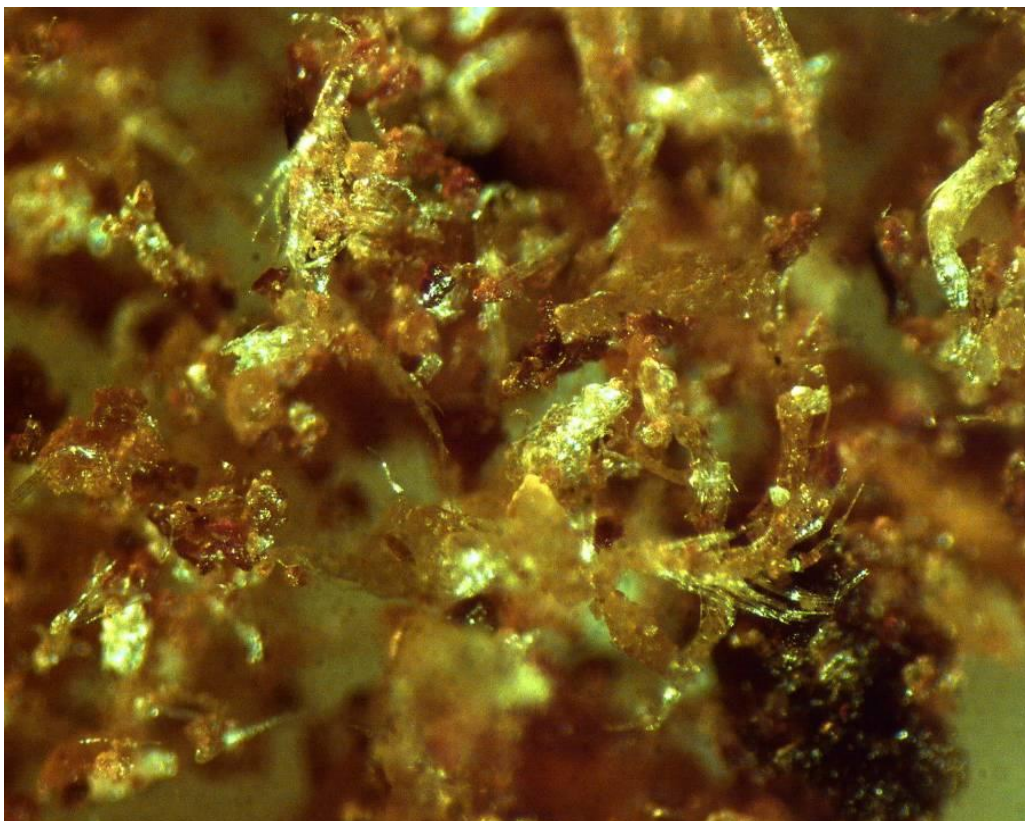
Fot. 5. Obraz mikroskopowy mączki mięsno-kostnej wołowo-wieprzowej (10x).



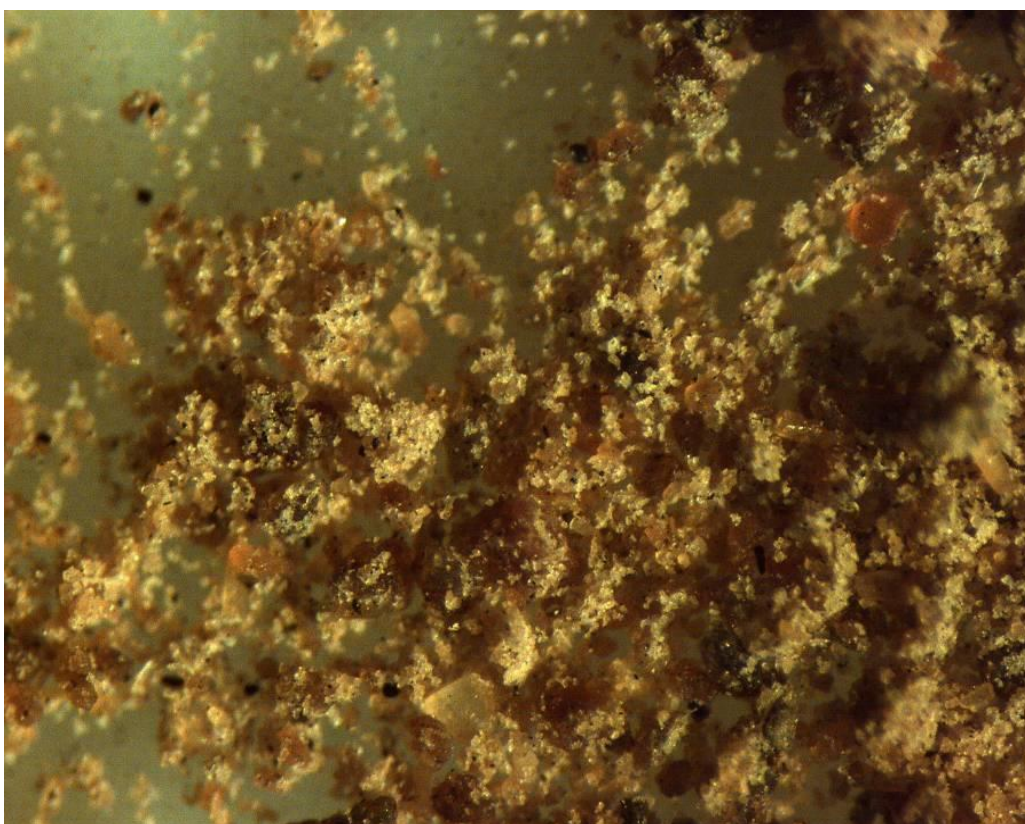
Fot. 6. Obraz mikroskopowy mączki mięsno-kostnej wieprzowej (10x).



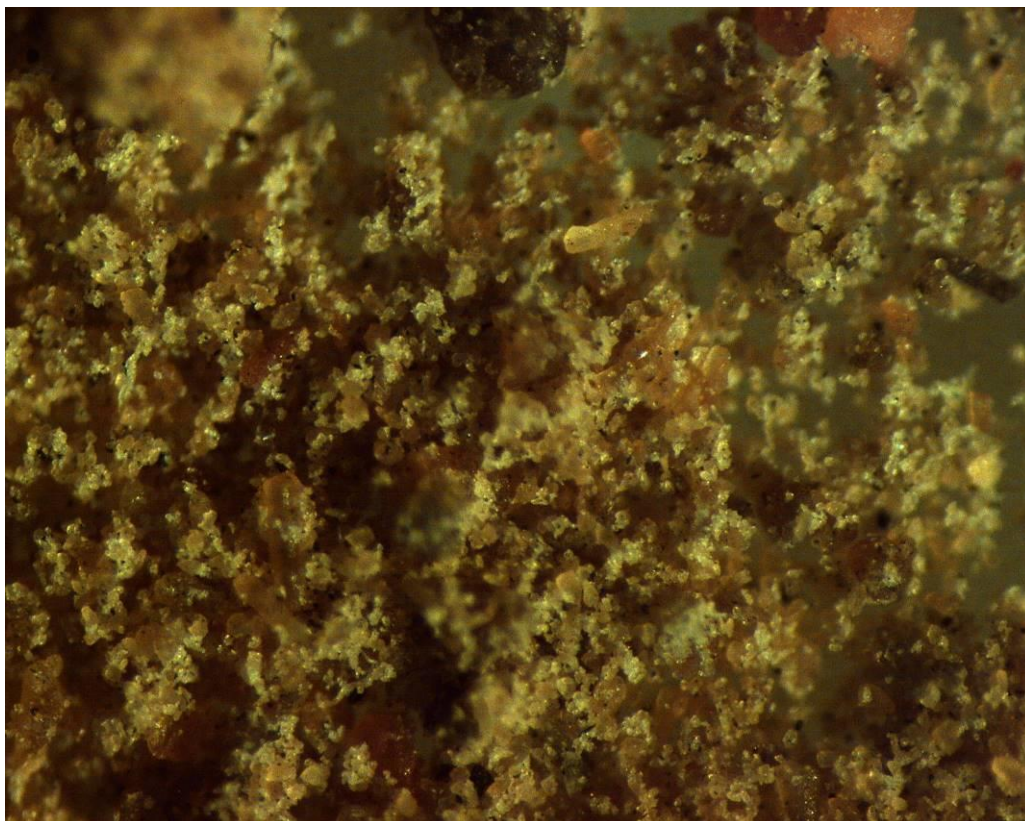
Fot. 7. Obraz mikroskopowy mączki mięsno-kostnej drobiowej (10x).



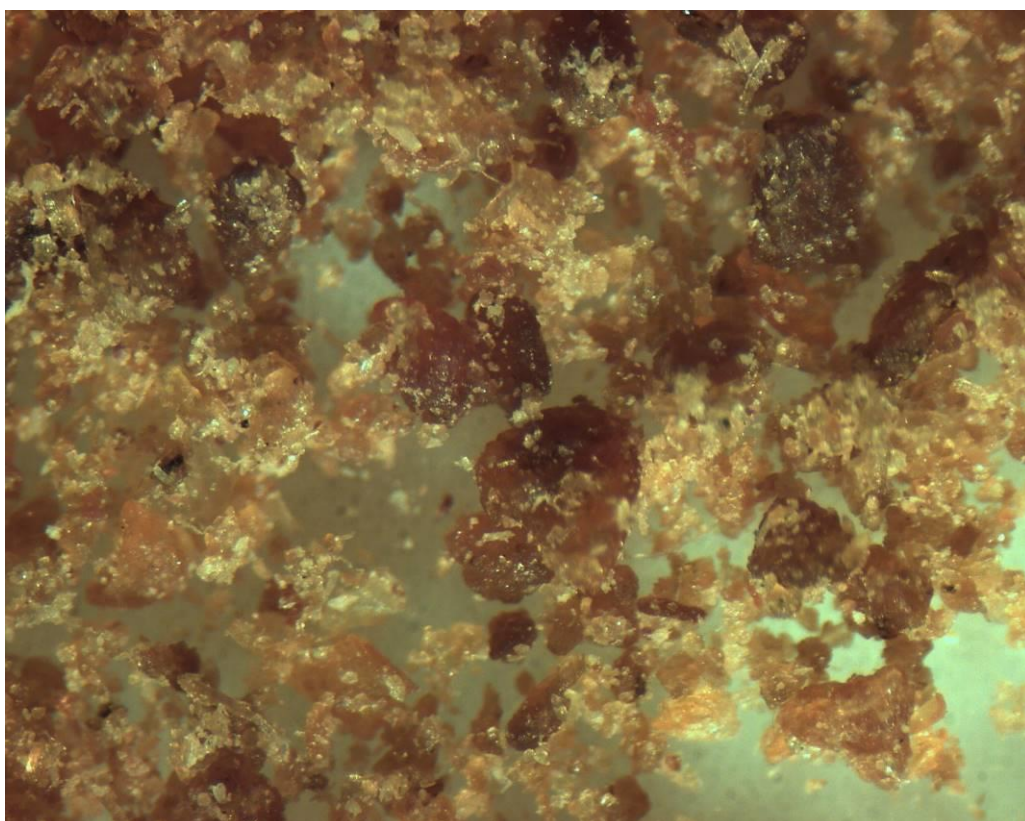
Fot. 8. Obraz mikroskopowy mączki z piór (20x).



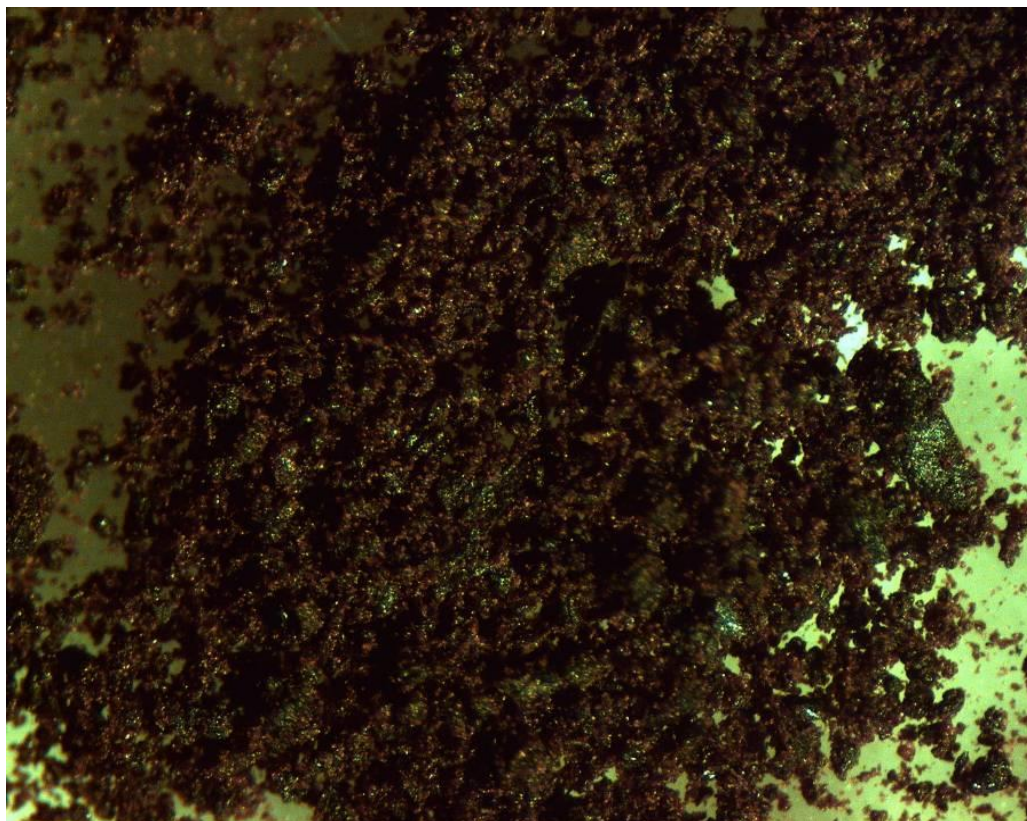
Fot. 9. Obraz mikroskopowy mączki rybnej (6,4x).



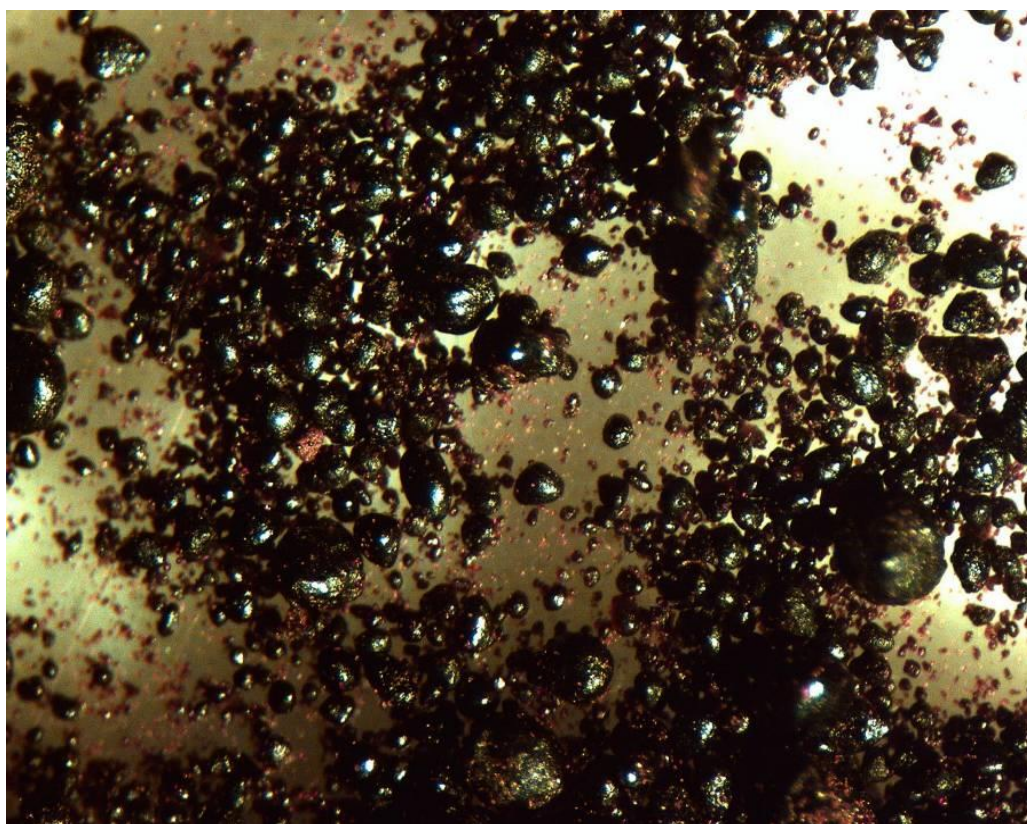
Fot. 10. Obraz mikroskopowy mączki rybnej (10x).



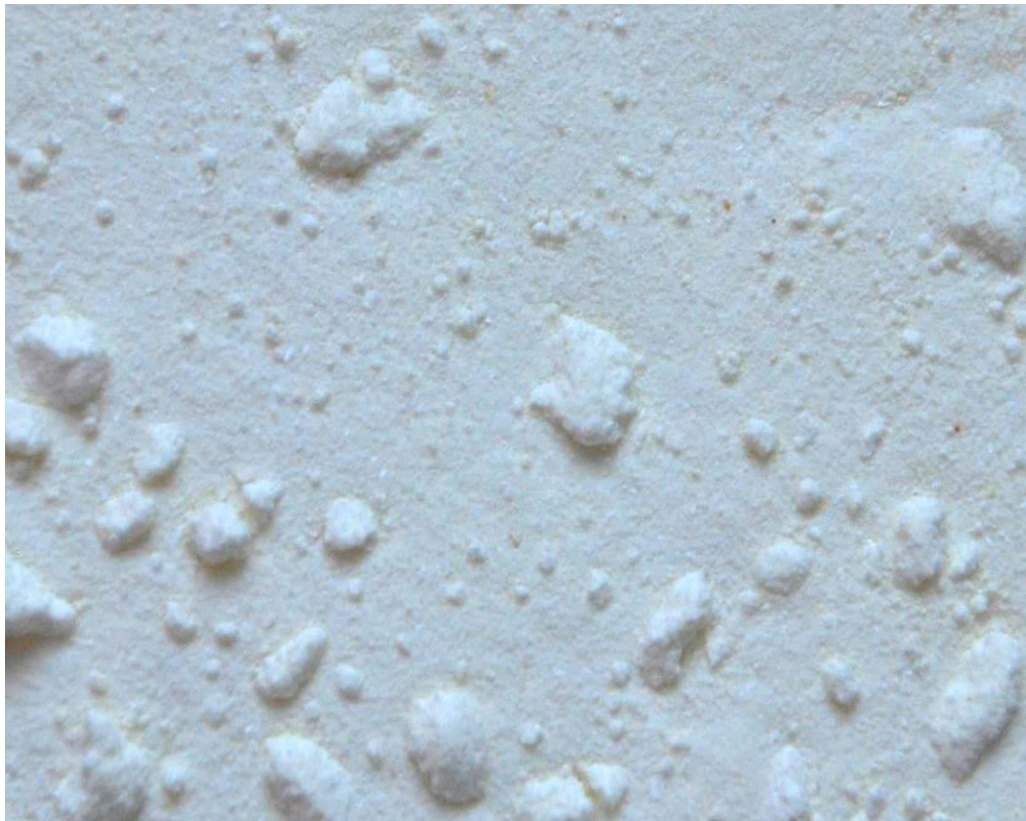
Fot. 11. Obraz mikroskopowy mączki rybnej (10x).



Fot. 12. Obraz mikroskopowy suszonej krwi pełnej (10x).



Fot. 13. Obraz mikroskopowy suszonej hemoglobiny (10x).



Fot. 14. Obraz mikroskopowy mleka w proszku (10x).



Fot. 15. Obraz mikroskopowy plazmy wieprzowej (10x).

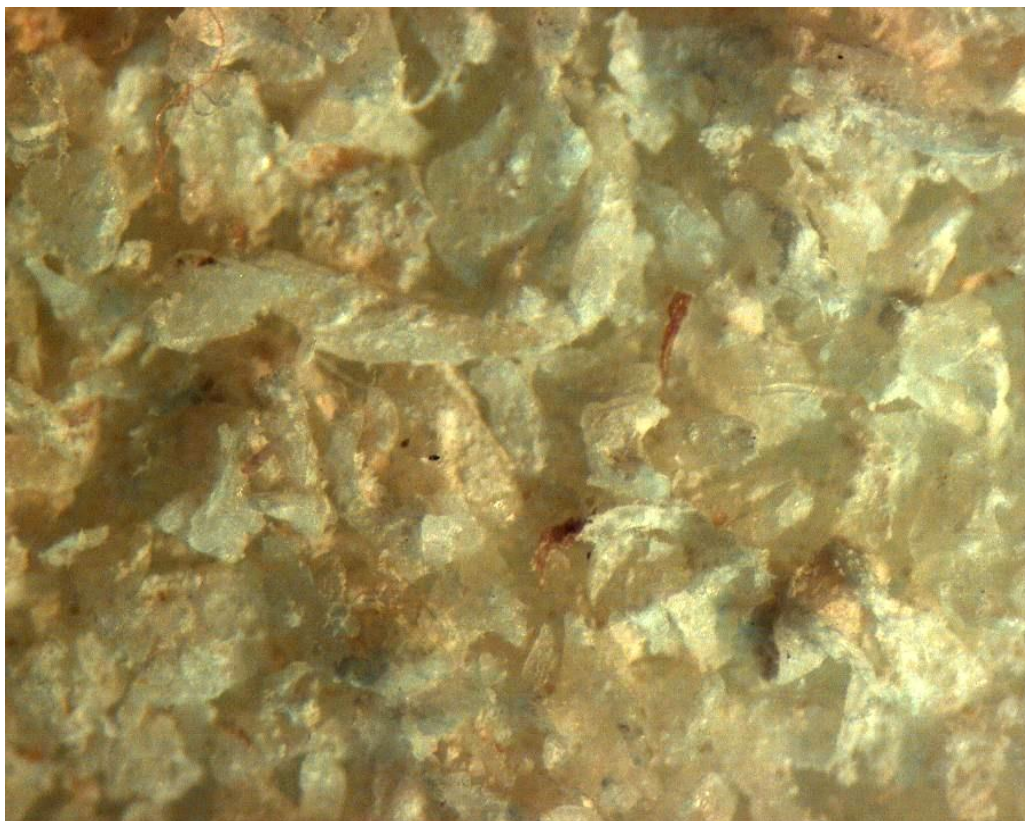
Identyfikacji poddawany jest skoncentrowany osad z próbki i flotat, uzyskiwany po sedymentacji przy użyciu teretachloroetyleny. Rozdzielenie próbki na dwie frakcje ułatwia identyfikację elementów pochodzenia zwierzęcego, a ponadto odtłuszcza materiał przez co obraz obserwowany przy użyciu mikroskopu jest wyraźniejszy.

W otrzymanym osadzie znajdują się składniki mineralne, piasek, a w przypadku obecności mączek mięsno-kostnych występują kości, chrząstki, ości ryb, otolity, skrzela. Natomiast flotat zawiera składniki roślinne, a w przypadku obecności przetworzonego białka zwierzęcego występują takie elementy jak: fragmenty piór, włosów, włókna mięśniowe, krew, skorupy jaj, globulki mleka, kryształy laktozy, fragmenty owadów paszowych.

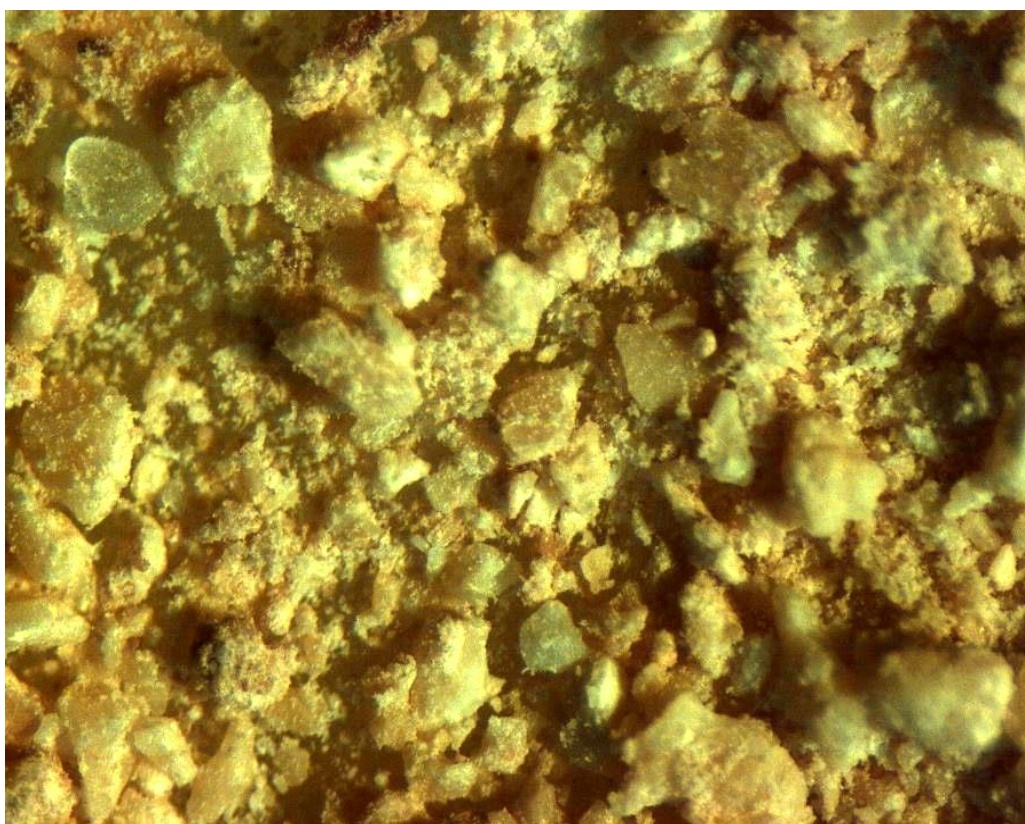
4.1. Wykrywanie elementów pochodzenia zwierzęcego w osadzie próbki

W zależności od pochodzenia mączki mięsno-kostnej występują różnice w ilości, wyglądzie i kolorze uzyskanego osadu. Proporcja kości w produktach zwierzęcych może znacznie się różnić. Zawartość kości w przypadku mączek kostnych wynosi od 50% do 60%, a w przypadku mączek mięsnych od 20% do 30%. Natomiast w mączkach rybnych zawartości ości i łusek zmieniają się w zależności od kategorii i pochodzenia mączki rybnej, wynoszą zwykle od 10% do 20% (Dyrektywa Rady 98/88/EC z dnia 13 listopada 1998 r.).

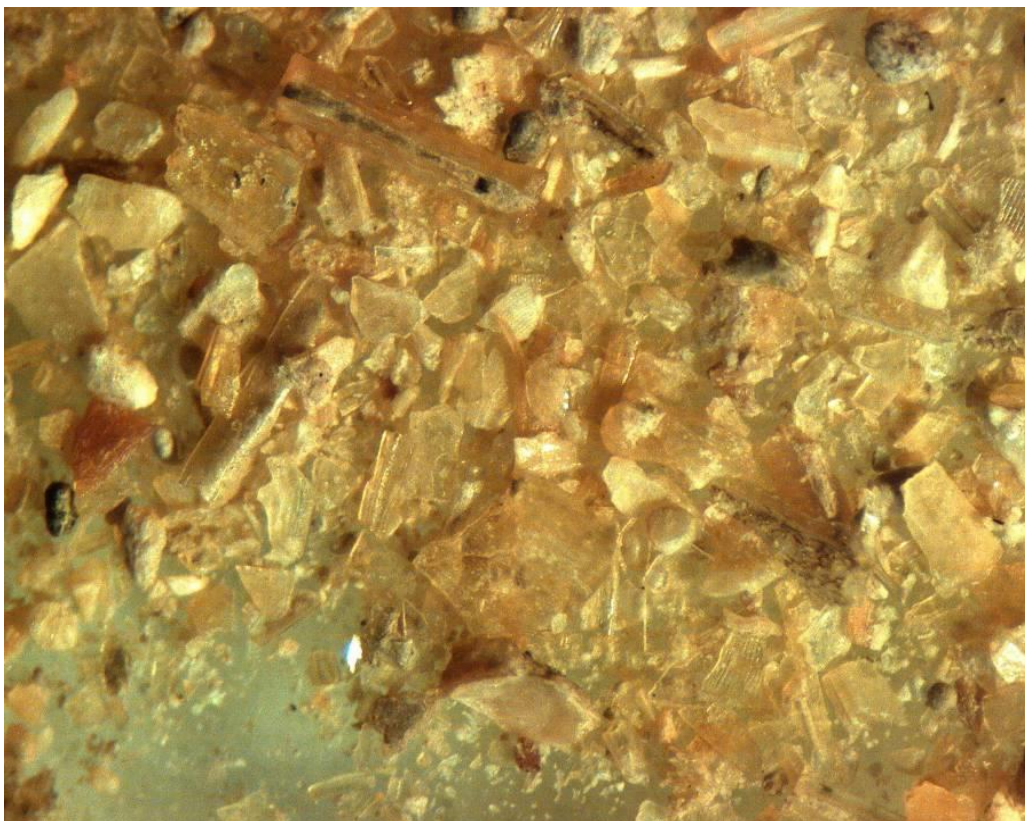
Elementy kostne ssaków są białe, kremowe lub szare. Ponadto mają kształt mniej lub bardziej kulisty oraz zaokrąglone krawędzie (Fot. 16, 20, 22). Natomiast kości drobiowe są zazwyczaj ciemniejsze, mają wydłużony kształt i ostre krawędzie (Fot. 17, 21, 22). Kości zwierząt lądowych są nieprzezroczyste (matowe), natomiast ości są bardziej przejrzyste (Fot. 18, 19, 23, 24).



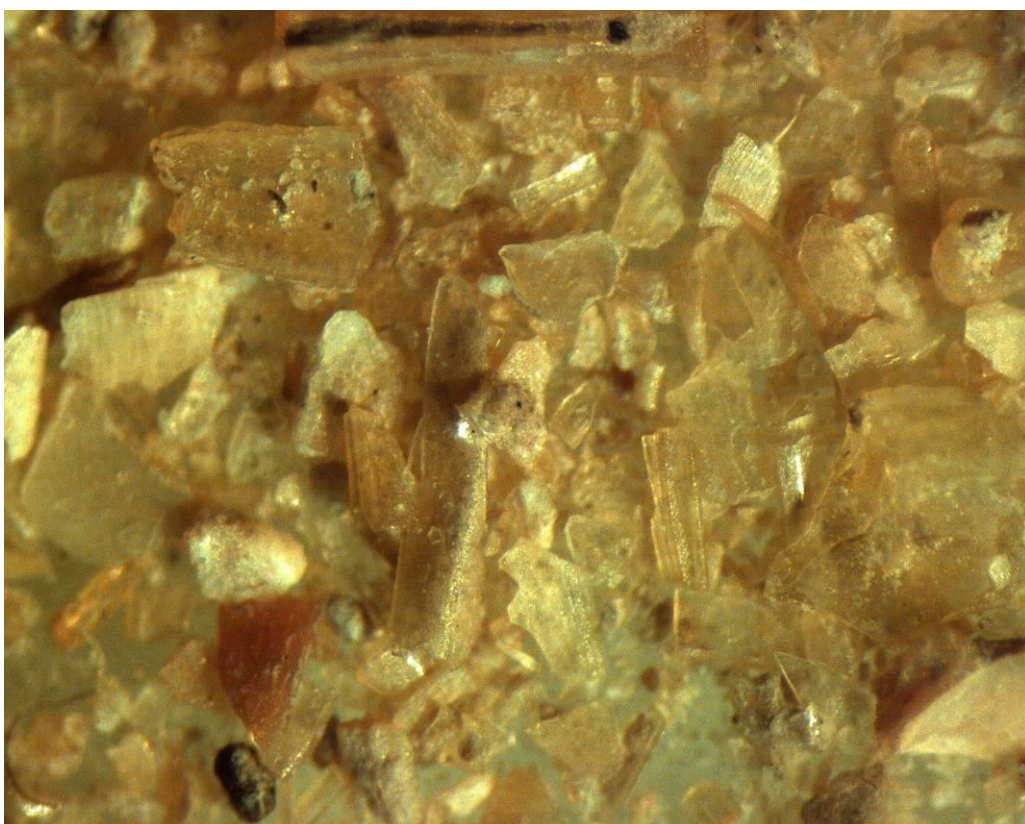
Fot. 16. Obraz mikroskopowy osadu mączki wołowej (10x).



Fot. 17. Obraz mikroskopowy osadu mączki drobiowej (10x).



Fot. 18. Obraz mikroskopowy osadu mączki rybnej zawierający fragmenty ości, kręgów, łusek, skrzel, mikroskop stereoskopowy, powiększenie 10x.



Fot. 19. Obraz mikroskopowy osadu mączki rybnej zawierający fragmenty ości, kręgów, łusek, skrzel, mikroskop stereoskopowy, powiększenie 10x.



Fot. 20. Obraz mikroskopowy kości wołowych, powiększenie 25x.



Fot. 21. Obraz mikroskopowy kości drobiowych, powiększenie 25x.



Fot. 22. Obraz mikroskopowy kości: (A) ssaków – charakterystyczne zaokrąglone krawędzie oraz (B) drobiu – drobne fragmenty o wydłużonym kształcie i ostrych krawędziach.

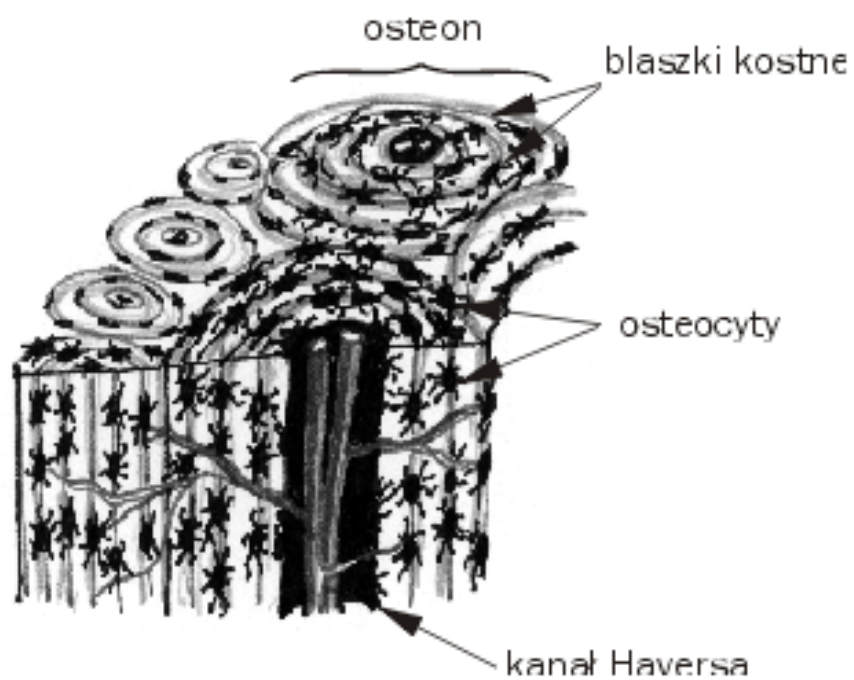


Fot. 23. Pojedynczy krąg szkieletu ryby, powiększenie 25x.



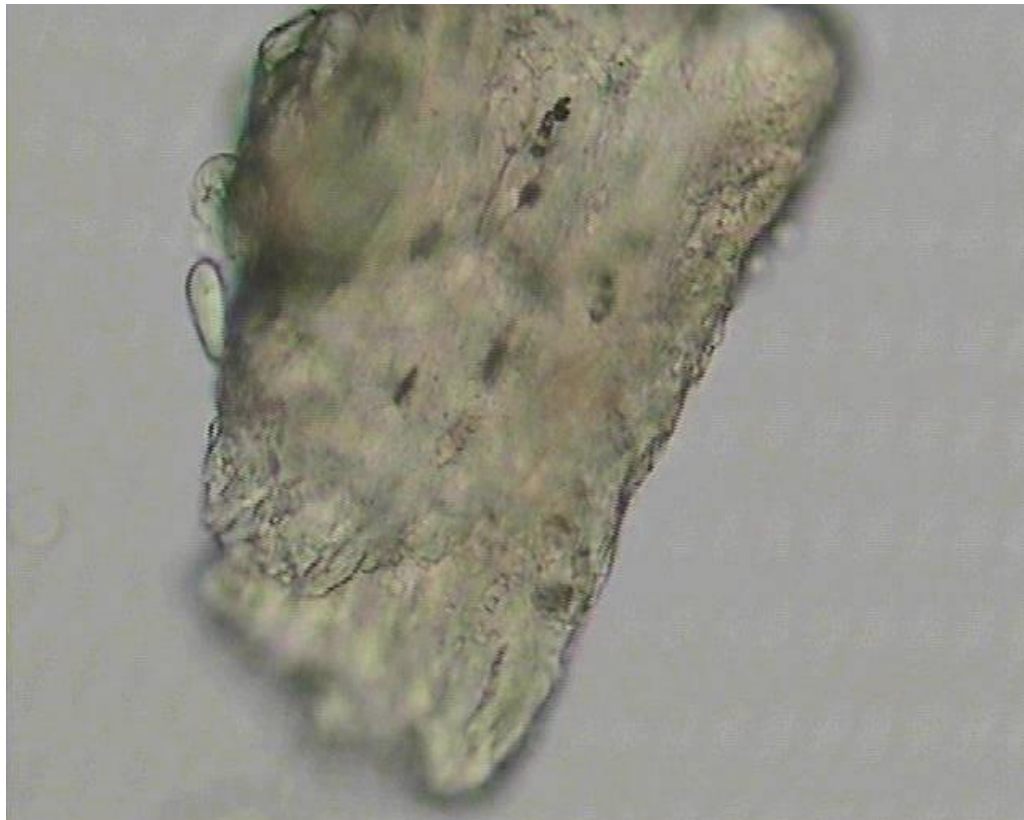
Fot. 24. Fragmenty ości i w części centralnej fragment łuski, powiększenie 40x.

Elementy kostne rozróżniane są przy użyciu mikroskopu biologicznego na podstawie obecności charakterystycznych jamek kostnych (łac. *lacunae*). W nich znajdują się osteocyty (*osteocytus*), czyli dojrzałe komórki kostne powstające z osteoblastów w wyniku ich mineralizacji. Wokół jamek kostnych przy powiększeniach (powyżej 100x) można dostrzec promieniście odchodzące kanaliki kostne (*caniculi*) zawierające wypustki cytoplazmatyczne osteocytów (Ryc. 1). System Haversa, osteon (*osteonum*), czyli podstawowa jednostka strukturalna i funkcjonalna tkanki kostnej zbitiej zbudowana jest z 6-15 cylindrycznych blaszek kostnych koncentrycznie ułożonych wokół kanału centralnego (Haversa).

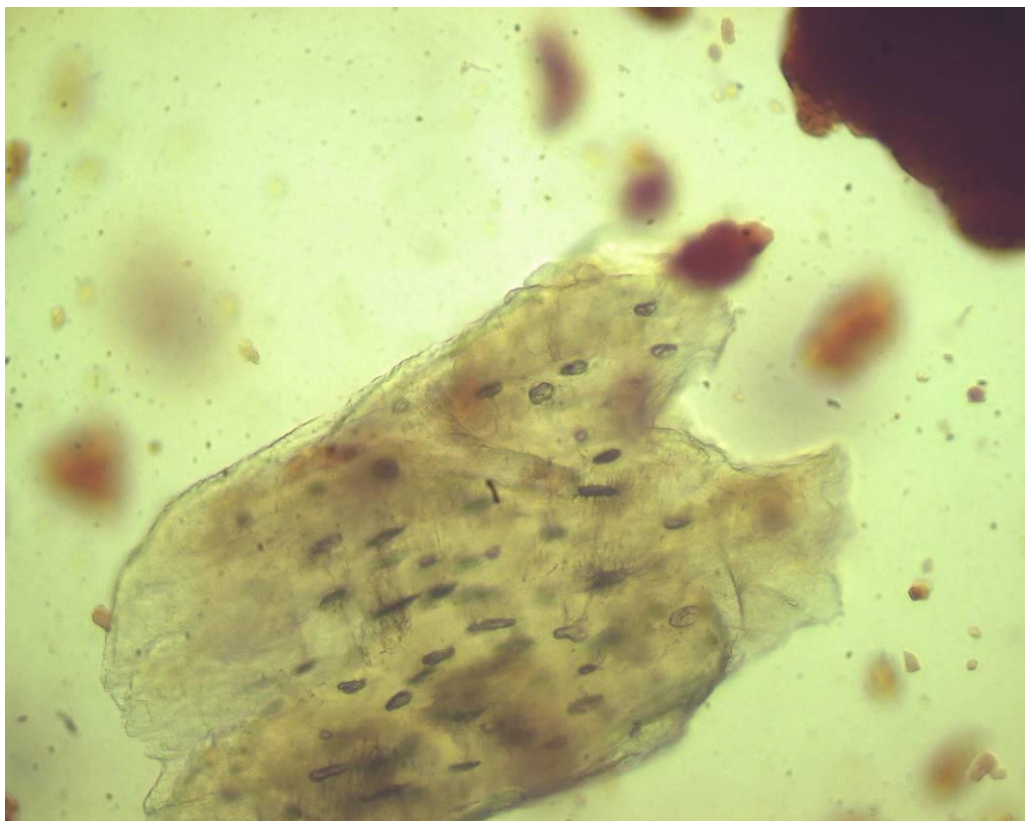


Ryc. 1. Schemat sytemu Haversa (Słownik biologiczny)

Elementy kostne pochodzące od ssaków posiadają jamki kostne o kształcie eliptycznym do prawie okrągłego z mało widocznymi kanalikami kostnymi (Fot. 25-52).



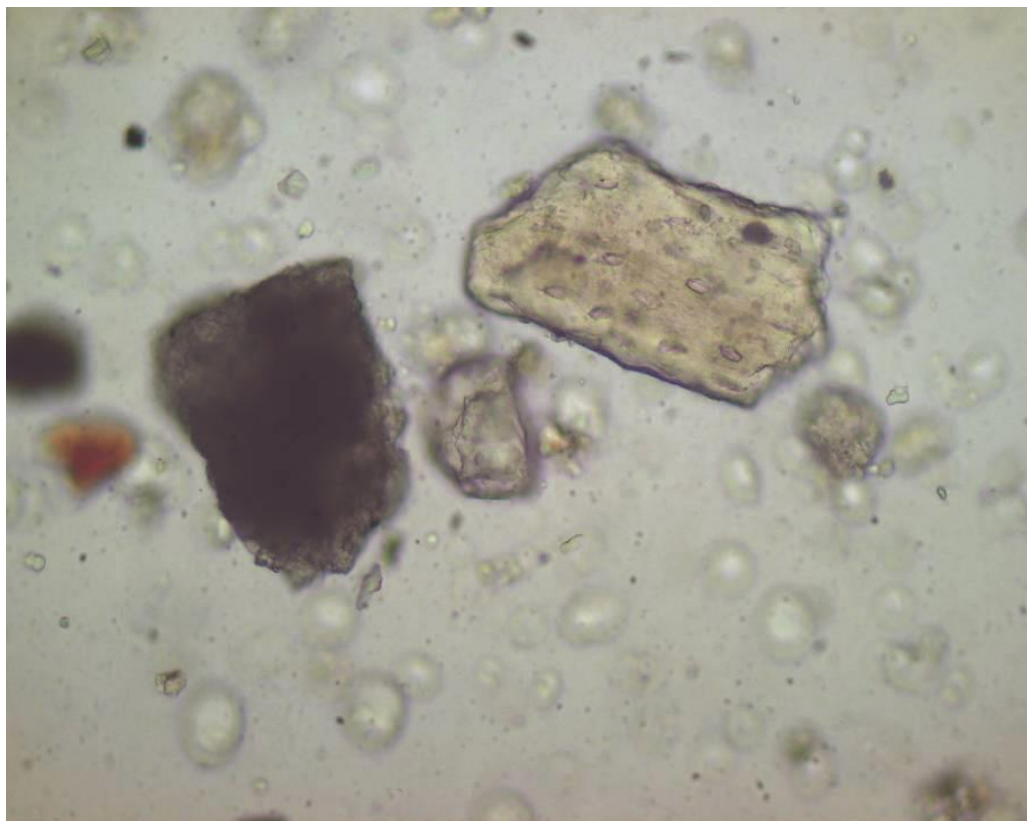
Fot. 25. Obraz mikroskopowy kości wołowej z widocznymi jamkami kostnymi (200x).



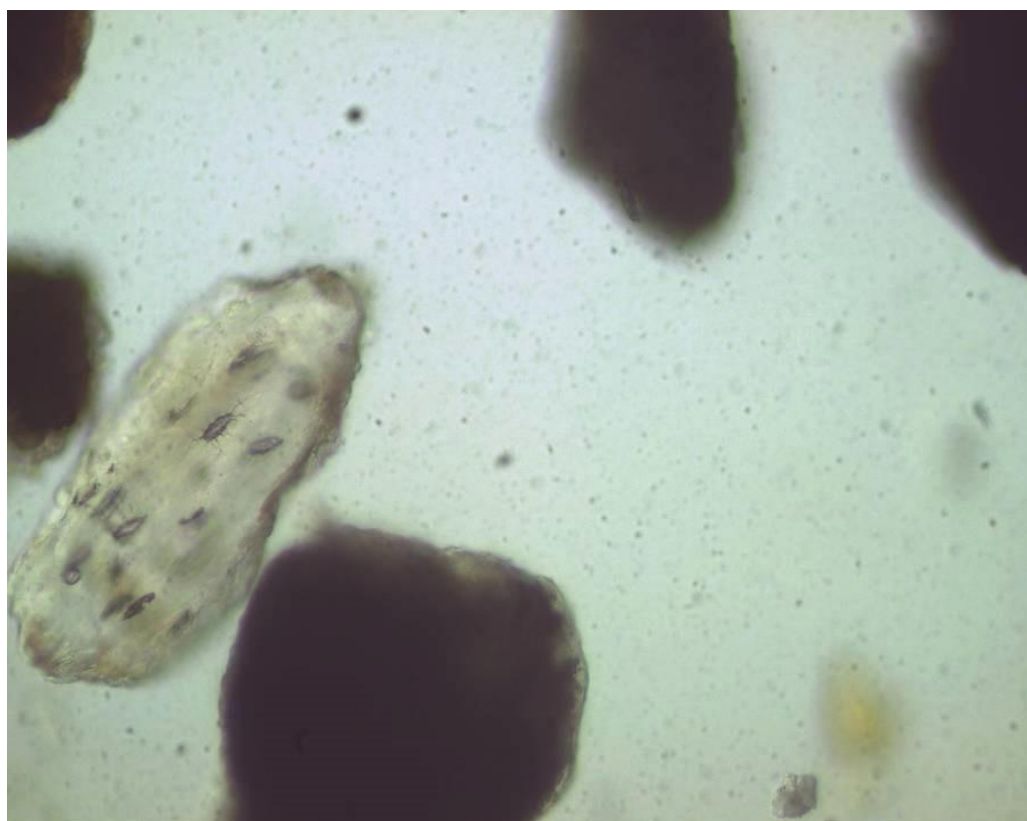
Fot. 26. Fragment kości wołowej widocznymi jamkami kostnymi i promieniście odchodzącymi kanalikami kostnymi (100x).



Fot. 27. Fragment kości wołowej z widocznymi jamkami kostnymi i promieniście odchodzącymi kanalikami kostnymi (100x).



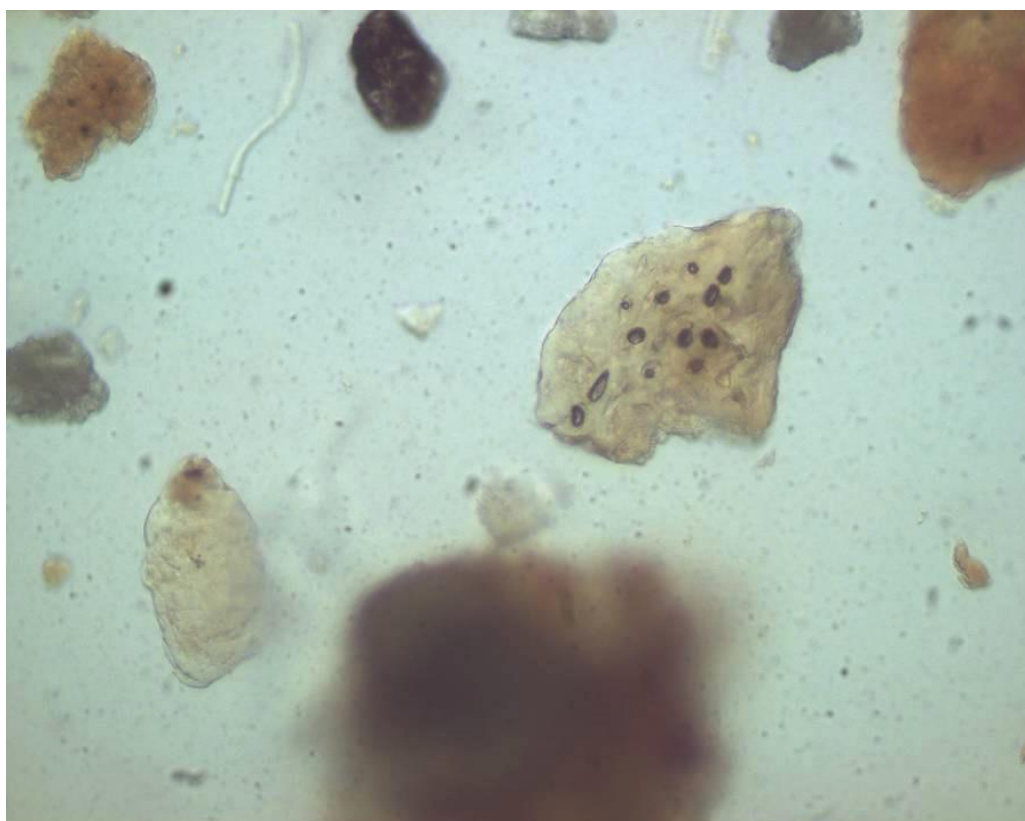
Fot. 28. Fragment kości wołowej w osadzie mieszanki paszowej (100x).



Fot. 29. Fragment kości wołowej w osadzie mieszanki paszowej (200x).



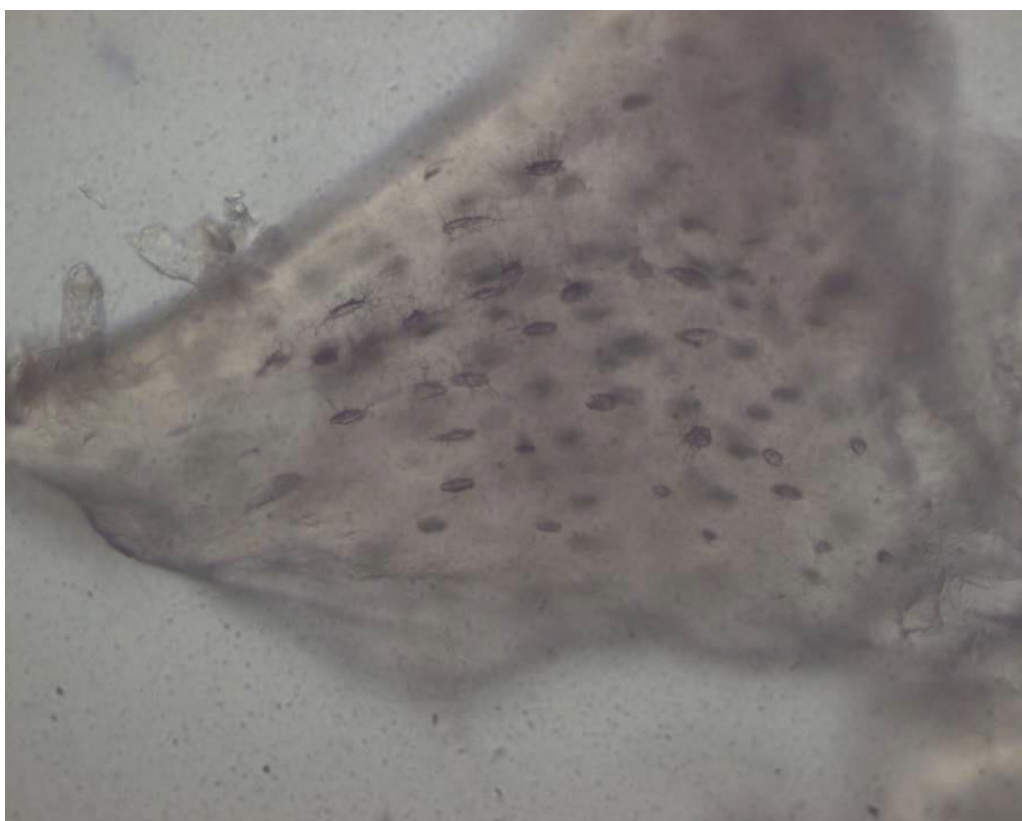
Fot. 30. Fragment kości wołowej (200x).



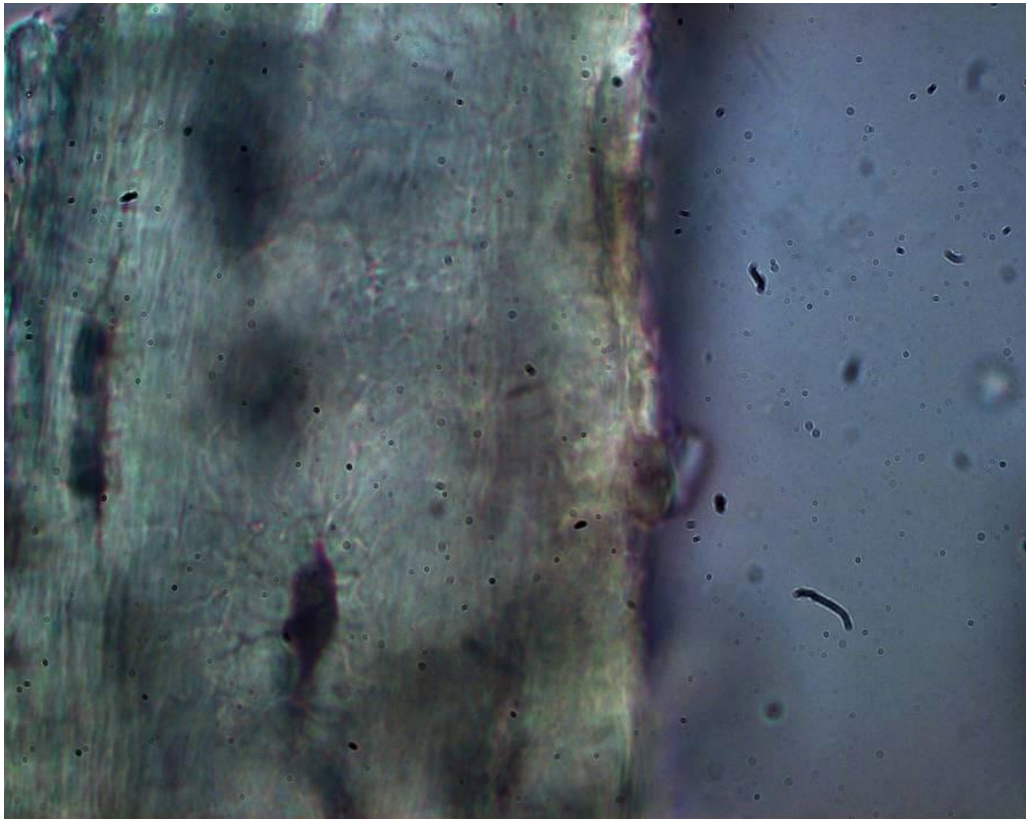
Fot. 31. Obraz mikroskopowy kości wołowej (200x).



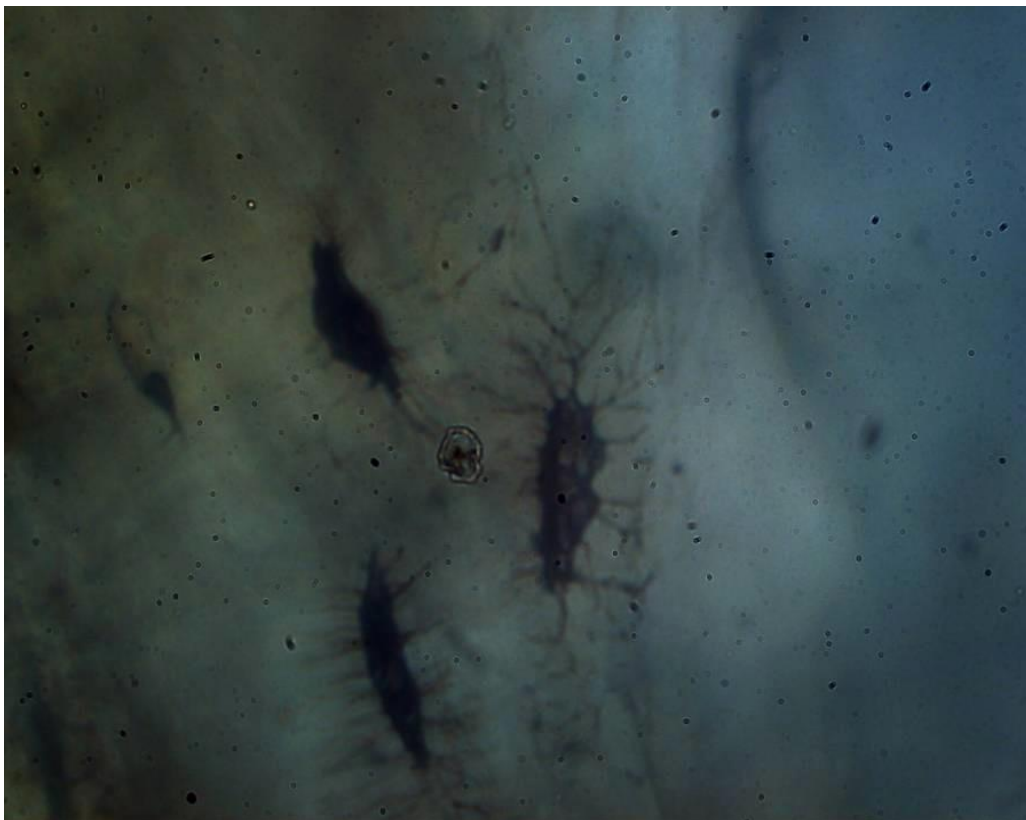
Fot. 32. Obraz mikroskopowy kości wołowej (200x).



Fot. 33. Obraz mikroskopowy kości wołowej (200x).



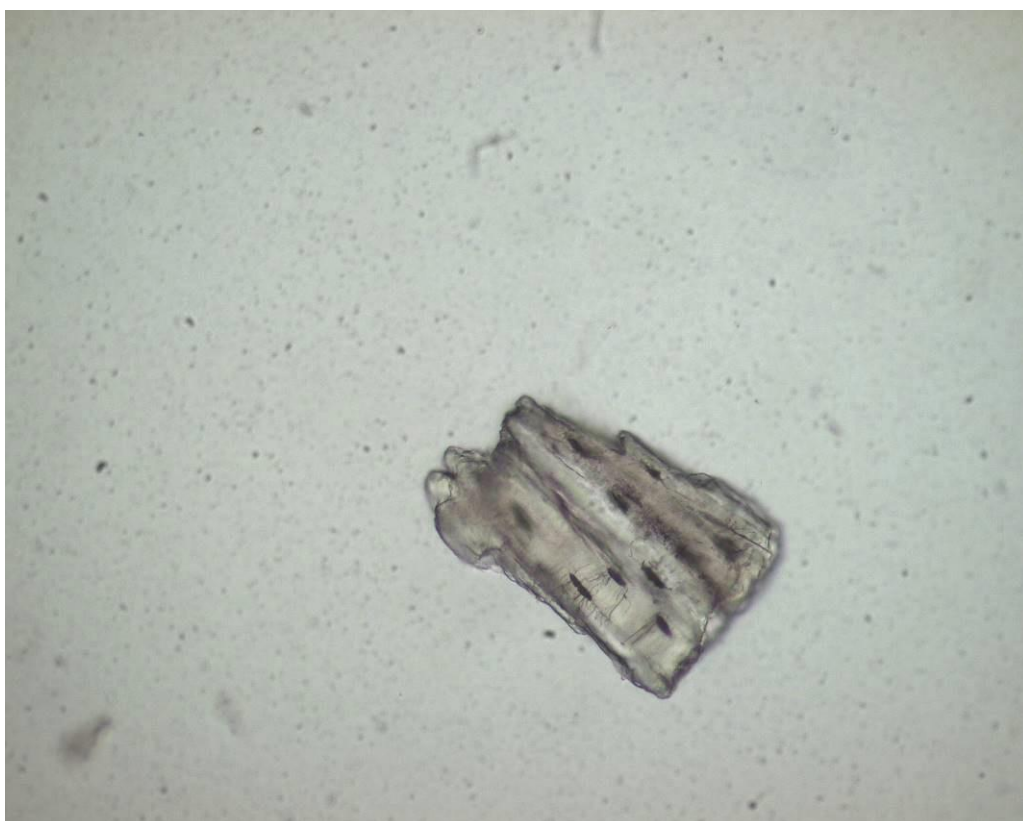
Fot. 34. Obraz mikroskopowy fragmentu kości wołowej (1000x).



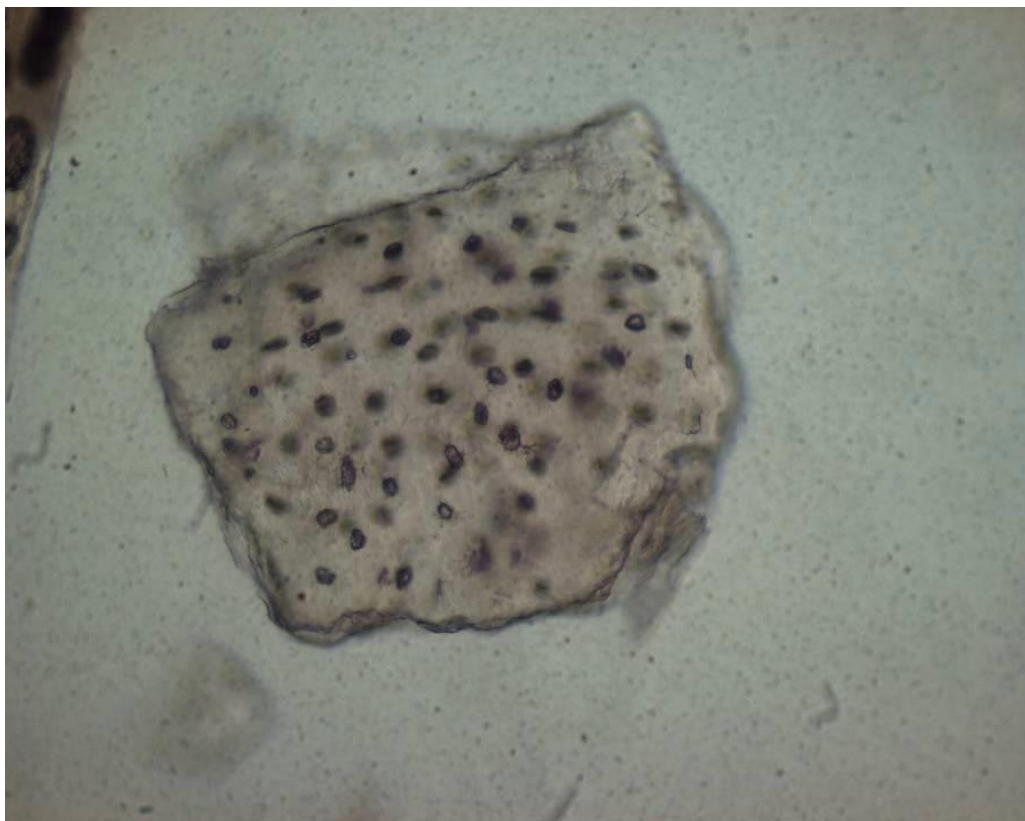
Fot. 35. Obraz mikroskopowy fragmentu kości wołowej (1000x).



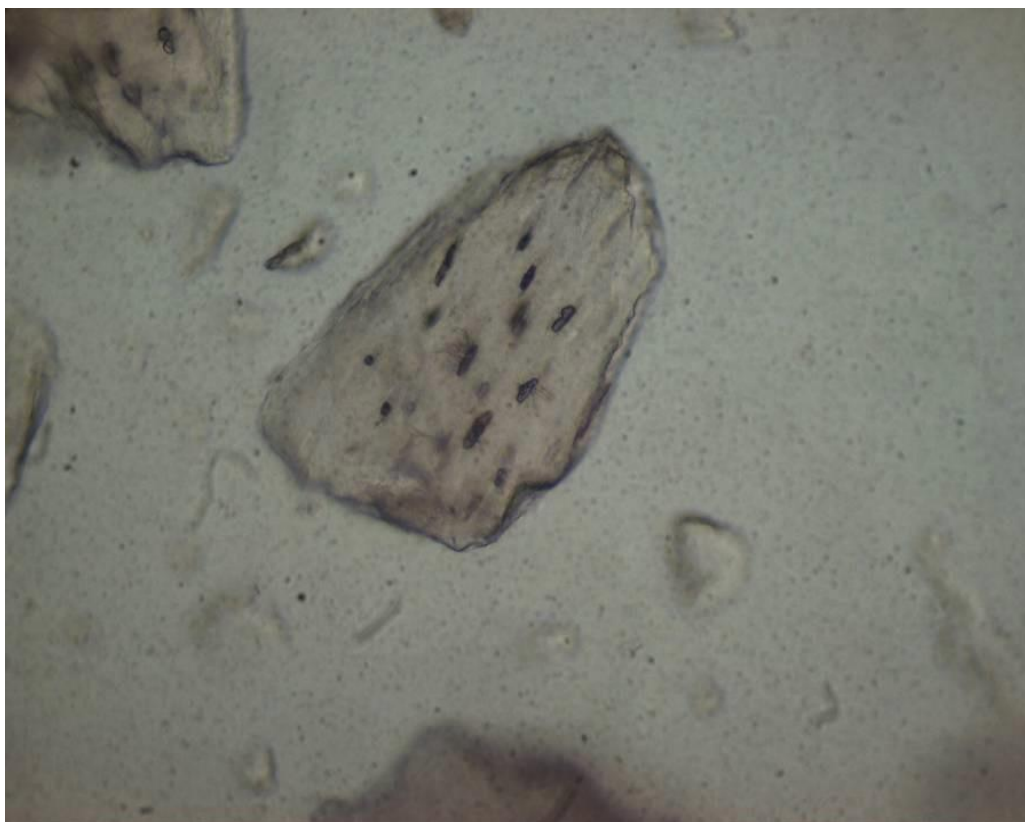
Fot. 36. Obraz mikroskopowy kości owczej (200x).



Fot. 37. Obraz mikroskopowy fragmentu kości owcy z widocznymi jamkami kostnymi (100x).



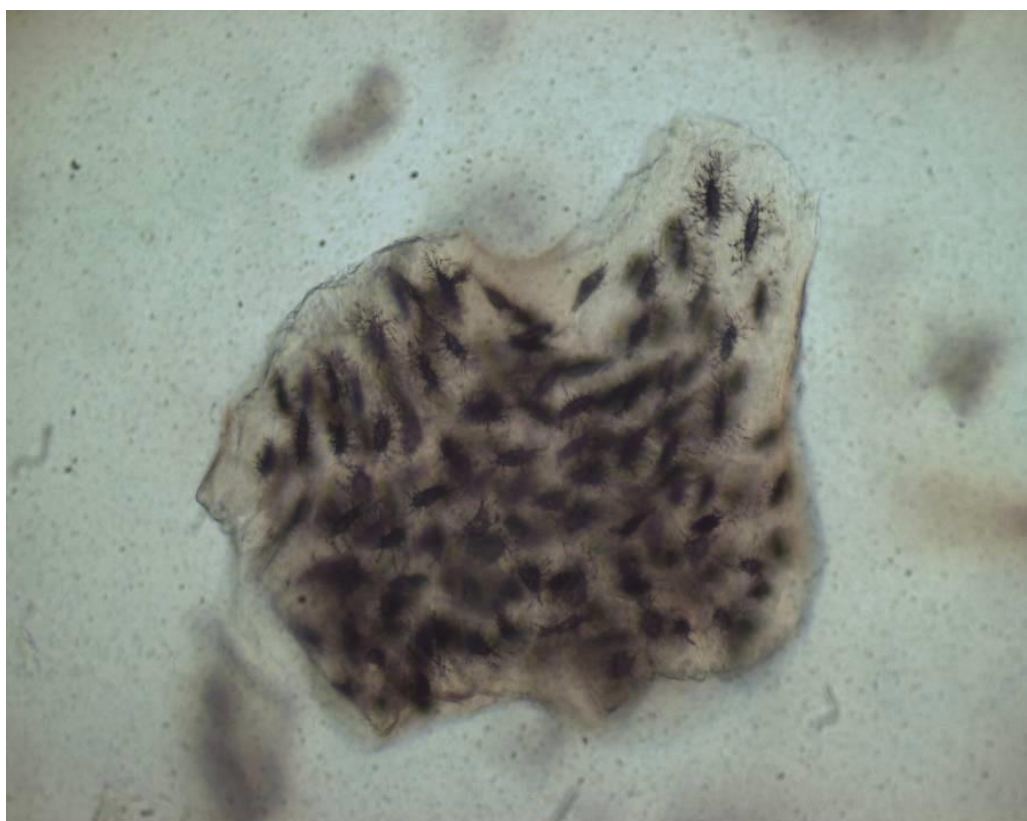
Fot. 38. Obraz mikroskopowy fragmentu kości owcy z widocznymi jamkami kostnymi (200x).



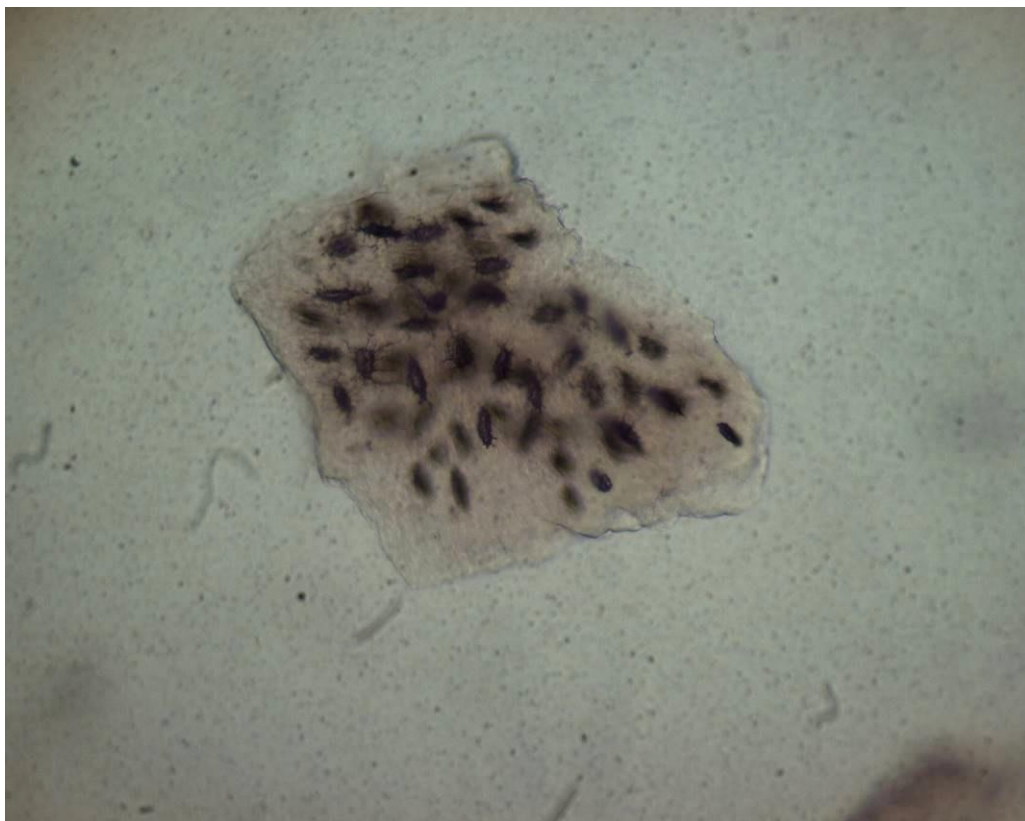
Fot. 39. Obraz mikroskopowy kości owcy (200x).



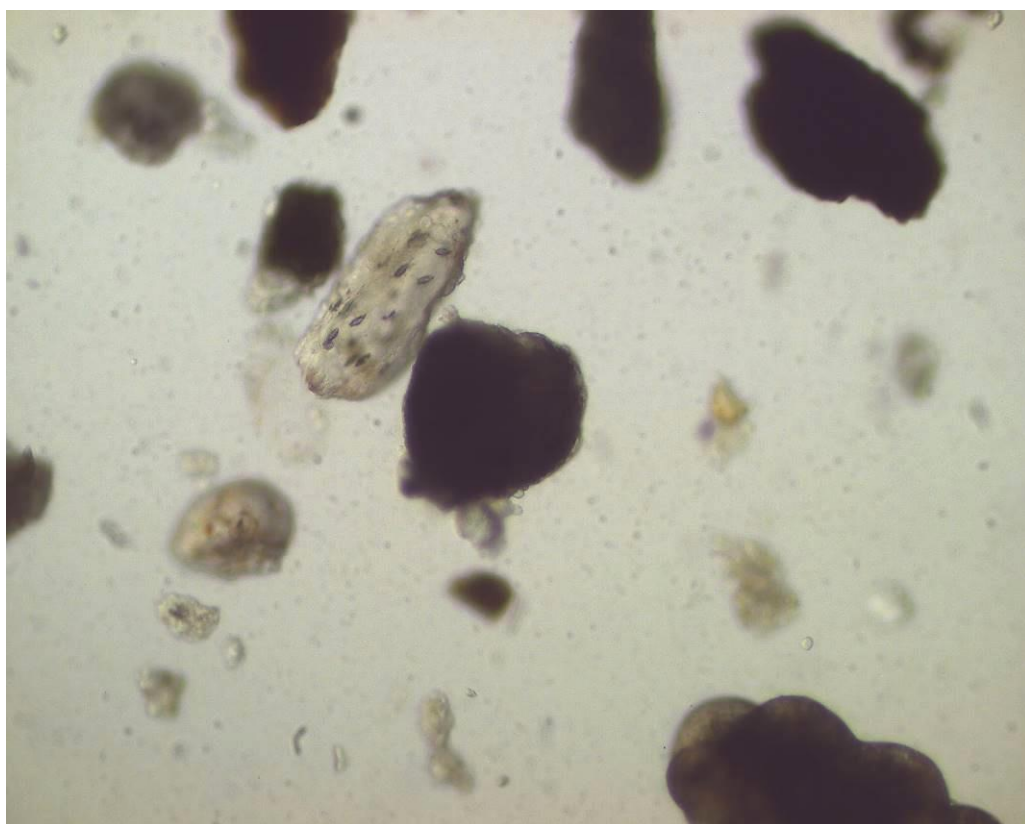
Fot. 40. Obraz mikroskopowy kości długiej kozy (200x).



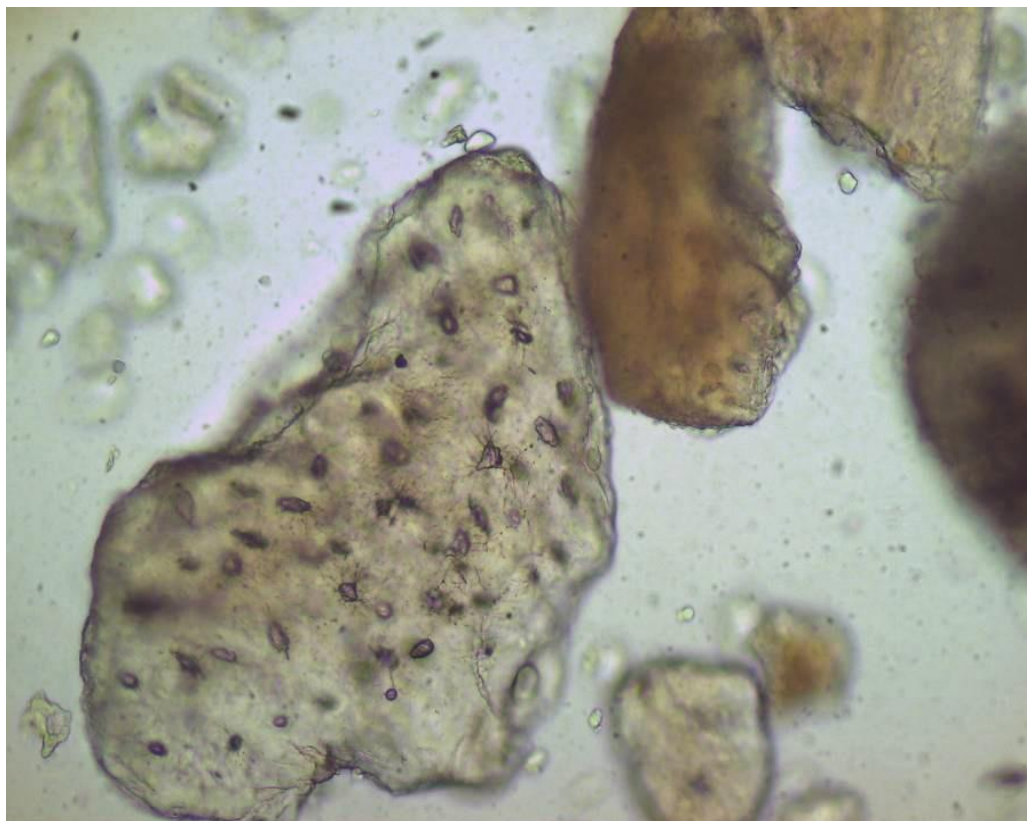
Fot. 41. Obraz mikroskopowy kości długiej kozy (200x).



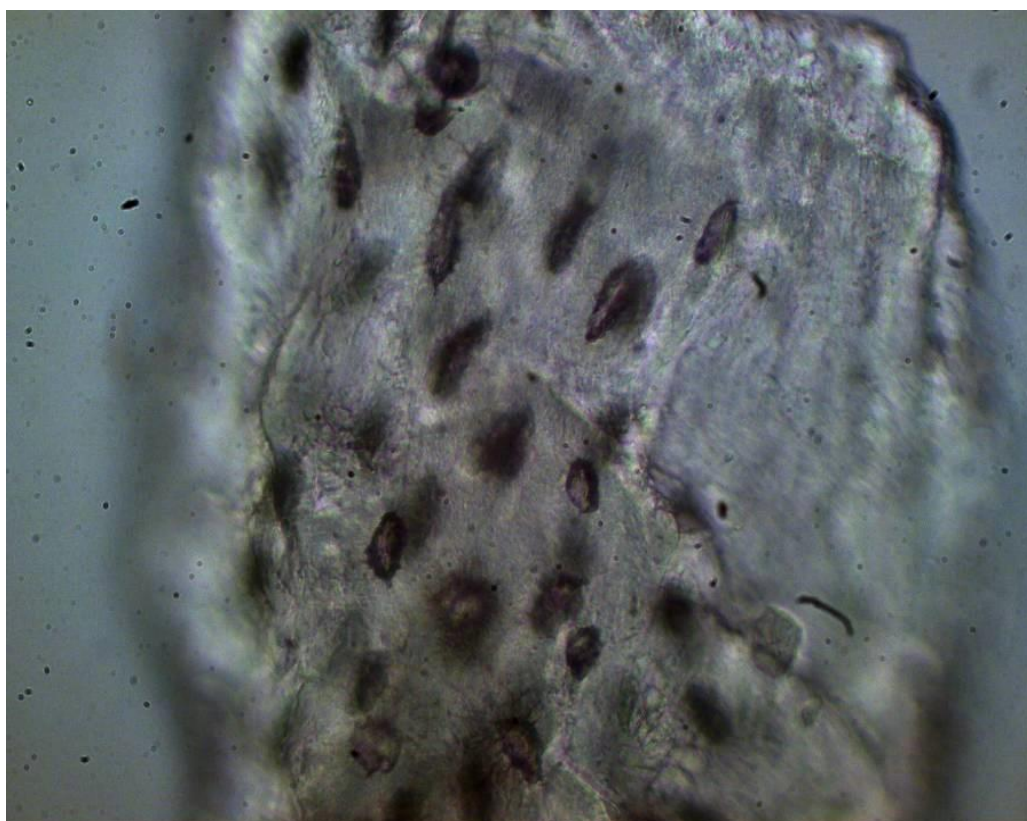
Fot. 42. Obraz mikroskopowy kości długiej kozy (200x).



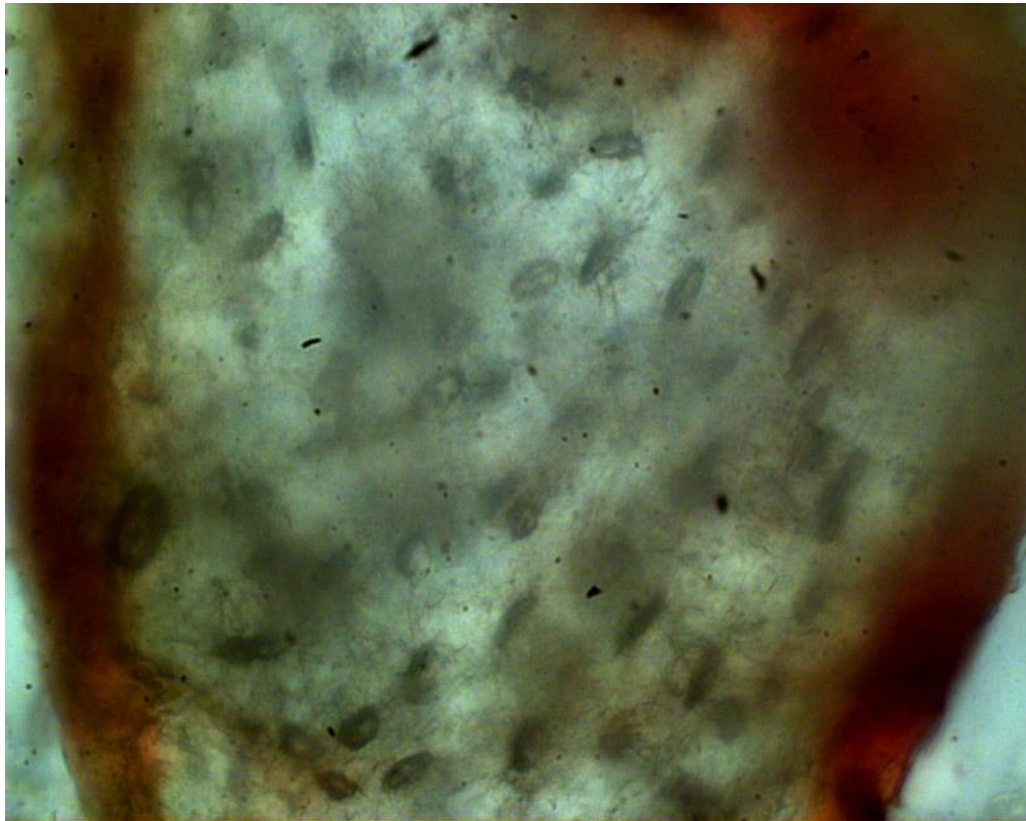
Fot. 43. Obraz mikroskopowy fragmentu kości wieprzowej (100x).



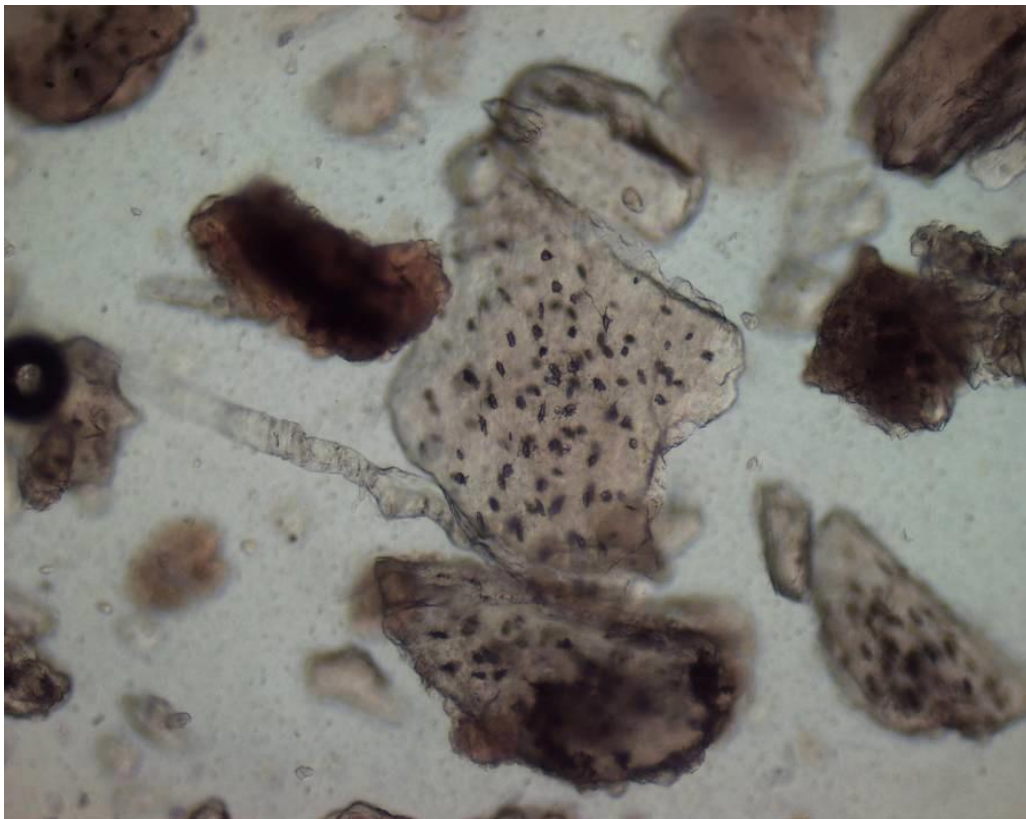
Fot. 44. Obraz mikroskopowy fragmentu kości wieprzowej (100x).



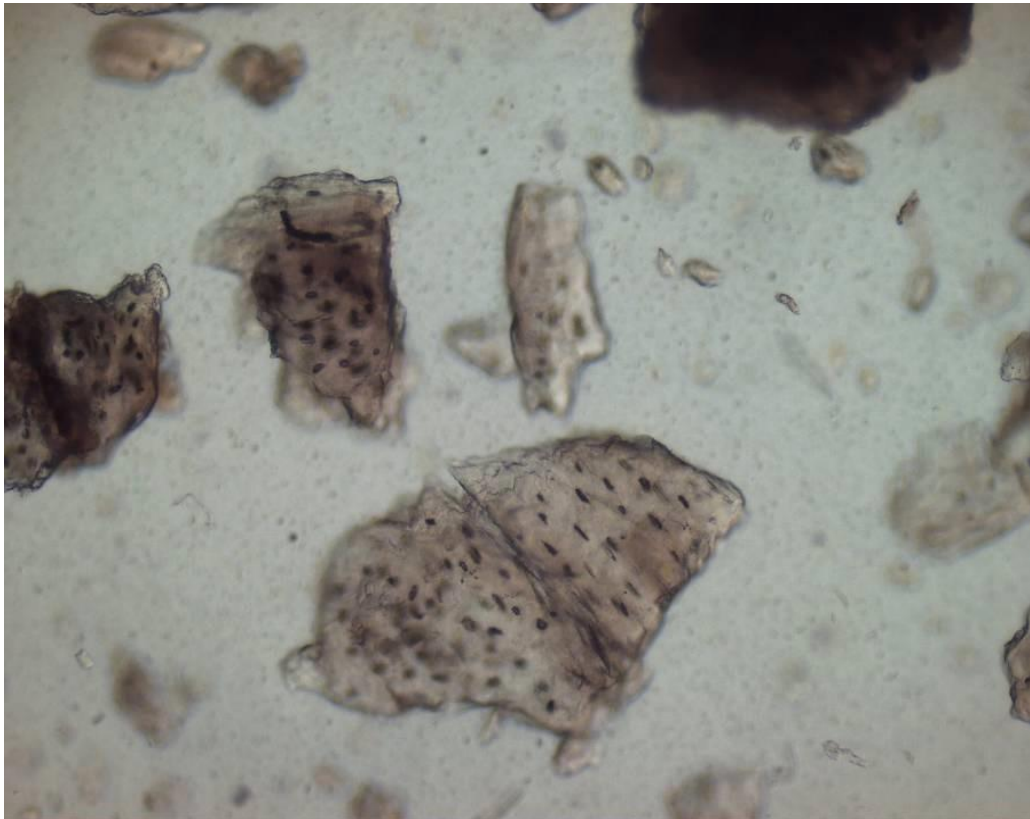
Fot. 45. Obraz mikroskopowy fragmentu kości wieprzowej (400x).



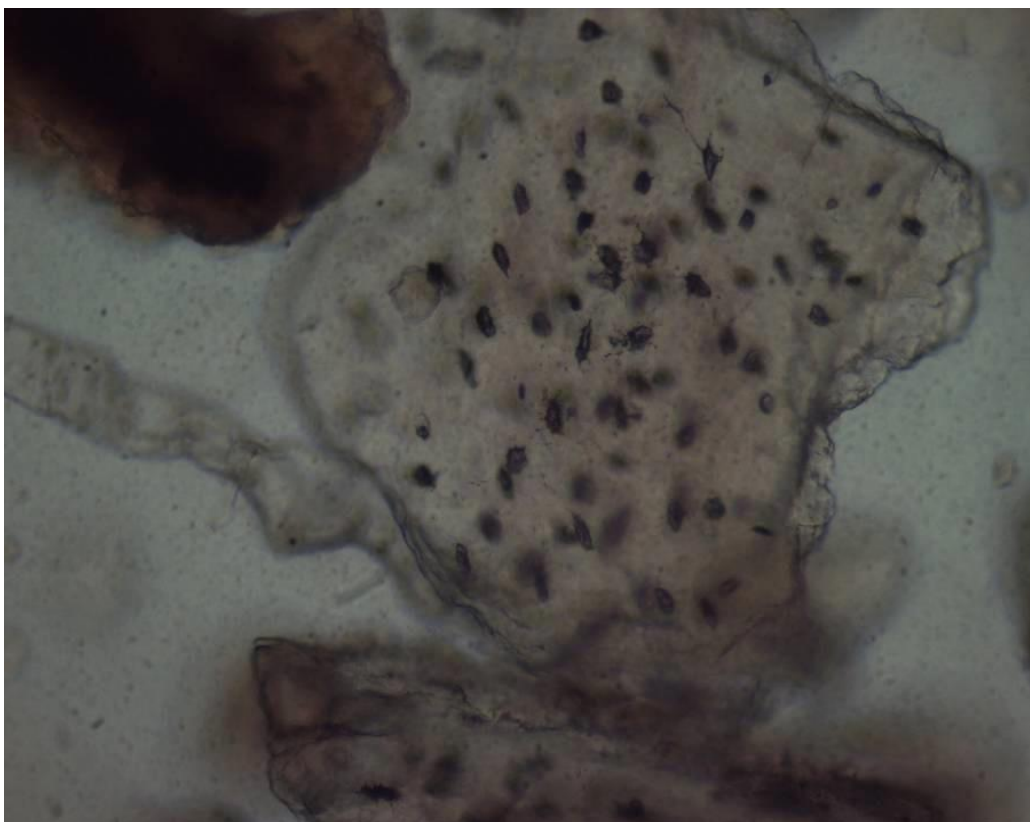
Fot. 46. Obraz mikroskopowy fragmentu kości wieprzowej (400x).



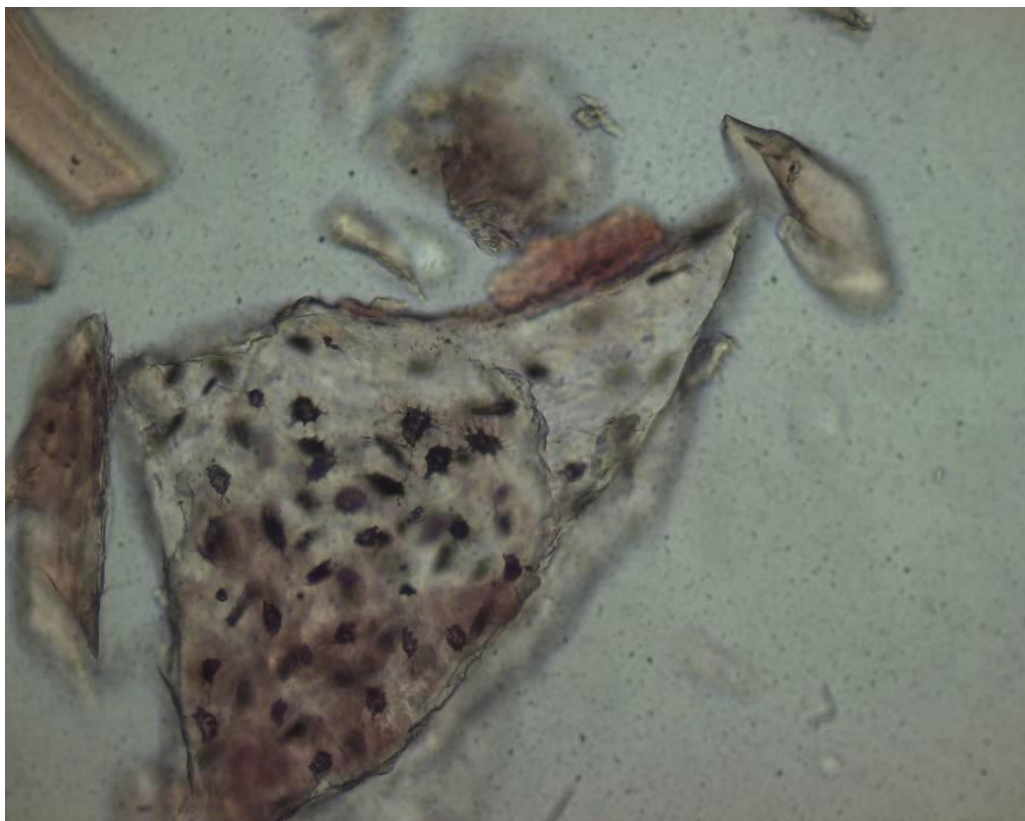
Fot. 47. Obraz mikroskopowy fragmentów kostnych konia (100x).



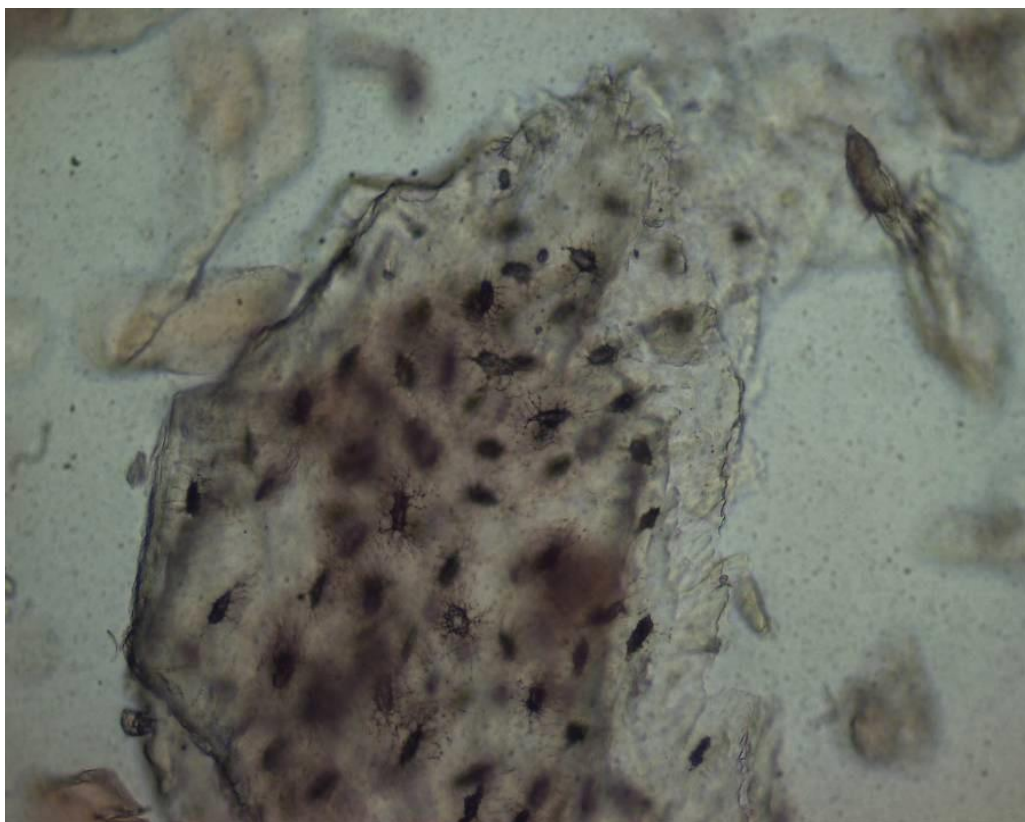
Fot. 48. Obraz mikroskopowy fragmentów kostnych konia (100x).



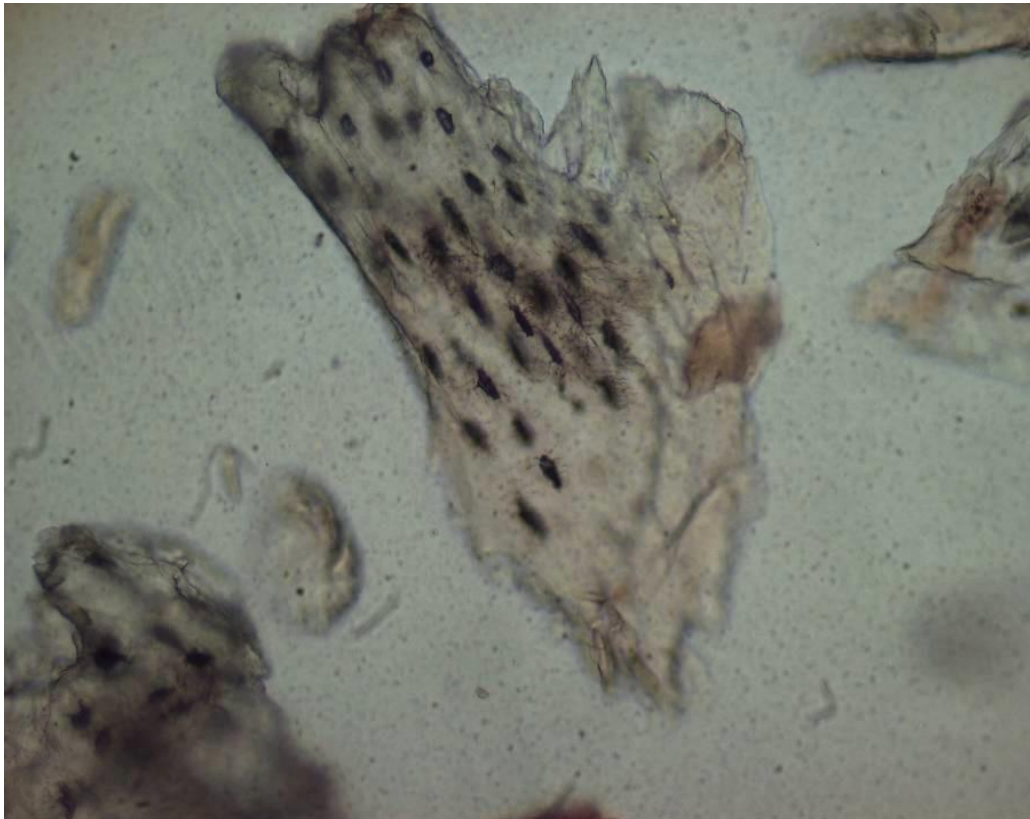
Fot. 49. Obraz mikroskopowy kości konia (200x).



Fot. 50. Obraz mikroskopowy fragmentu kości bobra (200x).



Fot. 51. Obraz mikroskopowy fragmentu kości bobra (200x).

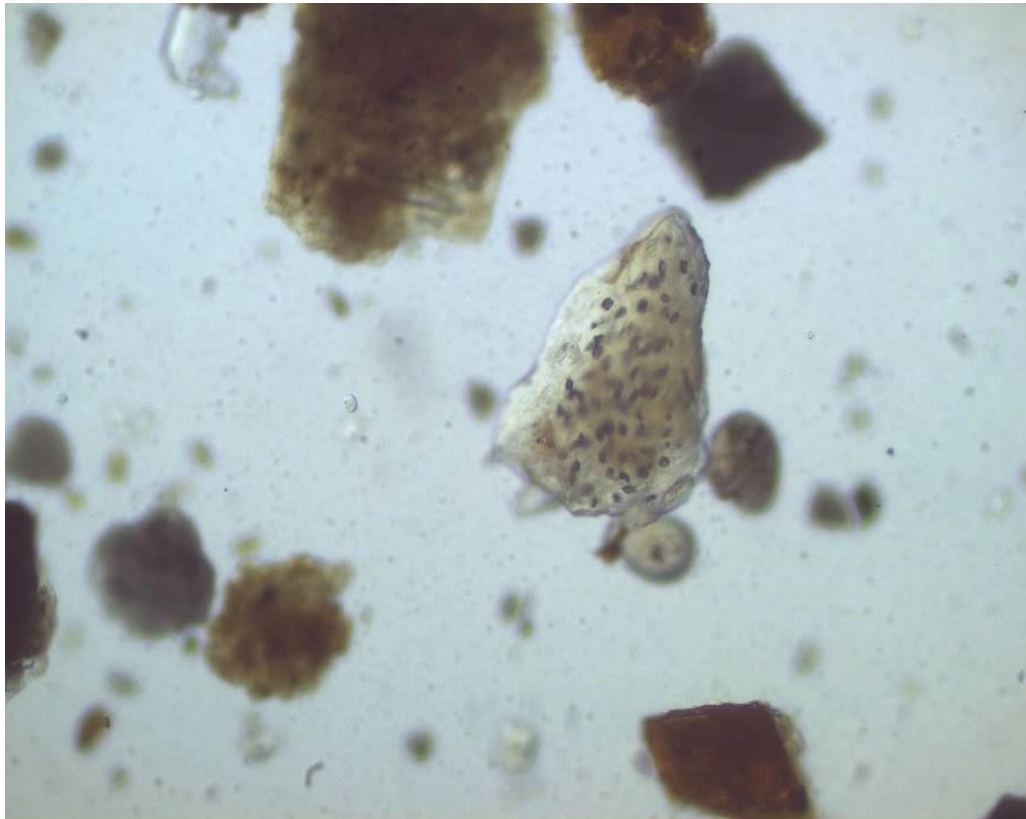


Fot. 52. Obraz mikroskopowy fragmentu kości bobra (200x).

W przypadku elementów kostnych drobiowych typowe jamki kostne są bardziej okrągłe, mniejsze i gęściej ułożone w porównaniu z kośćmi ssaków (Fot. 53-62). Natomiast kanaliki kostne są niewidoczne.

Kości ptaków są kośćmi pneumatycznymi, w których charakterystyczna jest obecność poduszek powietrznych widocznych w postaci pod mikroskopem po zatopieniu w oleju parafinowym czarnych otworów, dużo większych niż jamki kostne (Fot. 54, 57, 58).

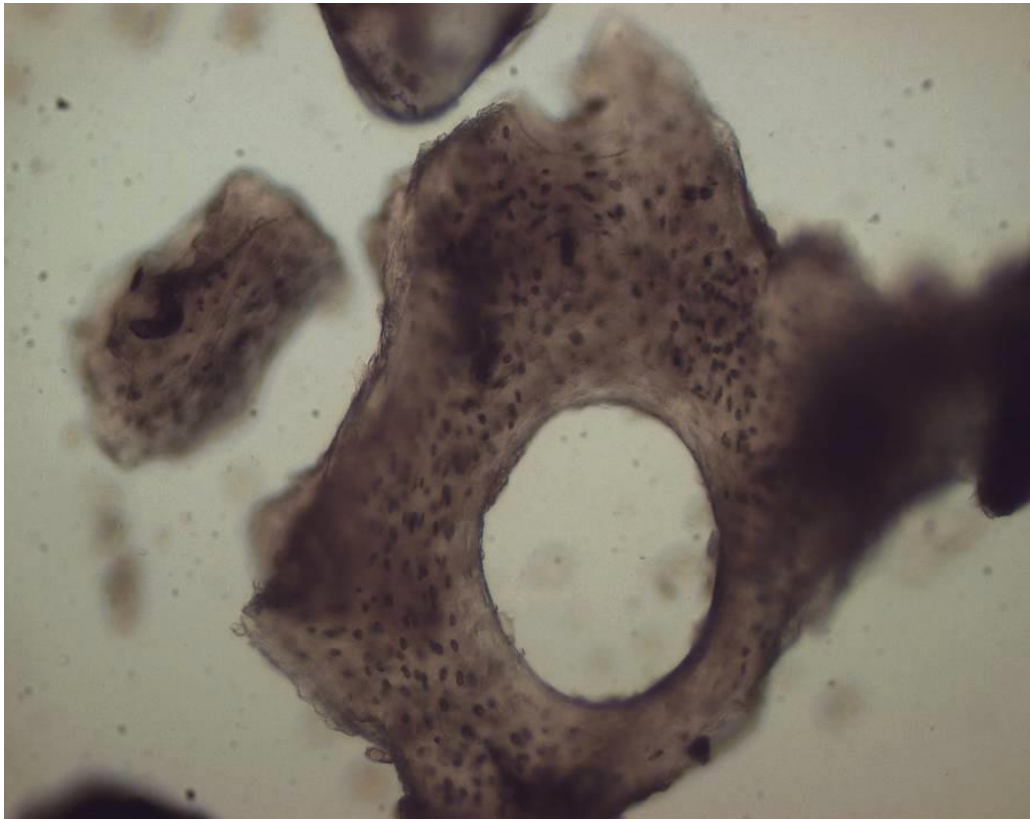
Niejednokrotnie nie jest możliwe odróżnienie kości drobiowych od kości ssaków. Kości młodych ssaków zazwyczaj mają drobniejsze i liczniejsze jamki kostne, a kanaliki kostne są bardzo słabo widoczne lub niewidoczne. Ponadto Dodatkowo nie zawsze jest możliwe odróżnienie rodzaju ssaka, z którego pochodzą elementy kostne. Z tego względu w formułowaniu wyników badań ograniczono się wyłącznie do określenia przynależności fragmentów kostnych do zwierząt lądowych lub do ryb.



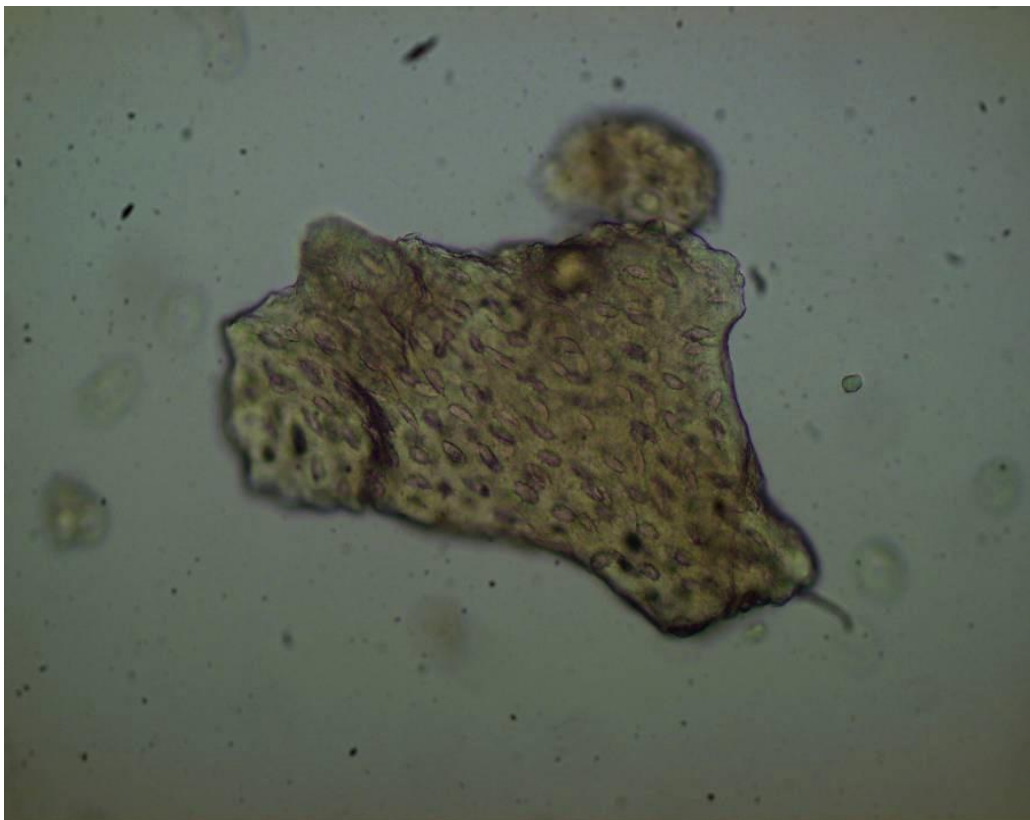
Fot. 53. Obraz mikroskopowy fragmentu kości drobiowej (100x).



Fot. 54. Fragment kości drobiowej (200x).



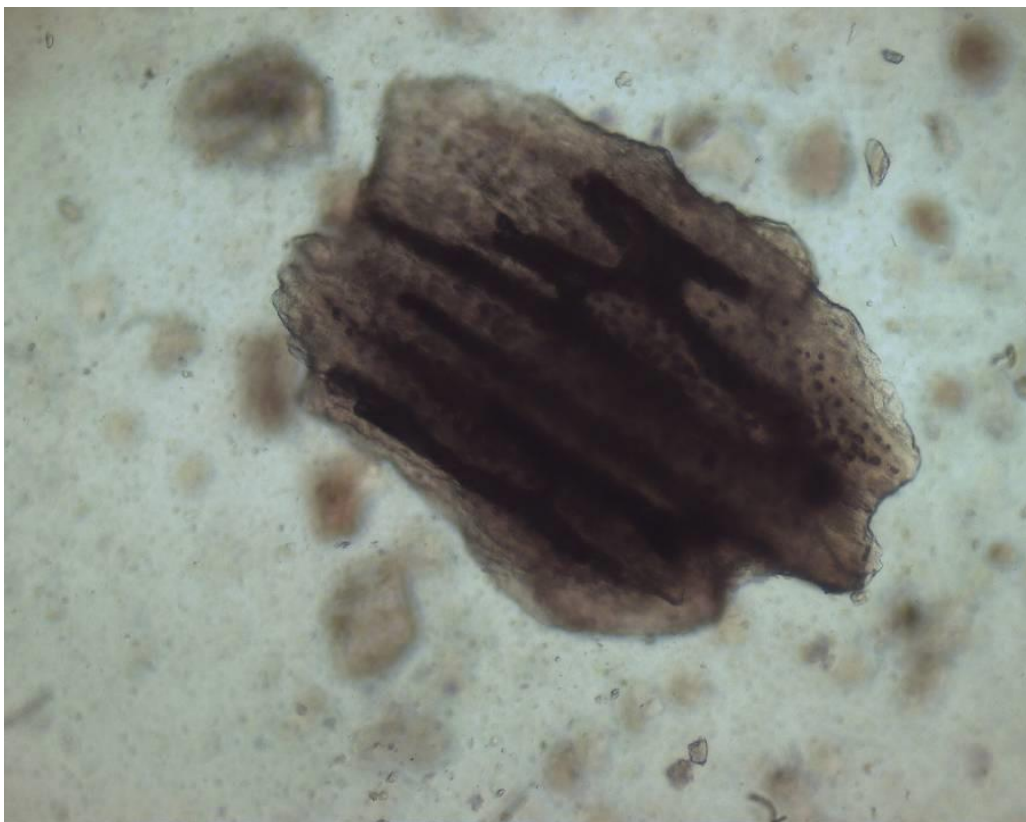
Fot. 55. Fragment kości z widocznym kanałem Haversa (100x).



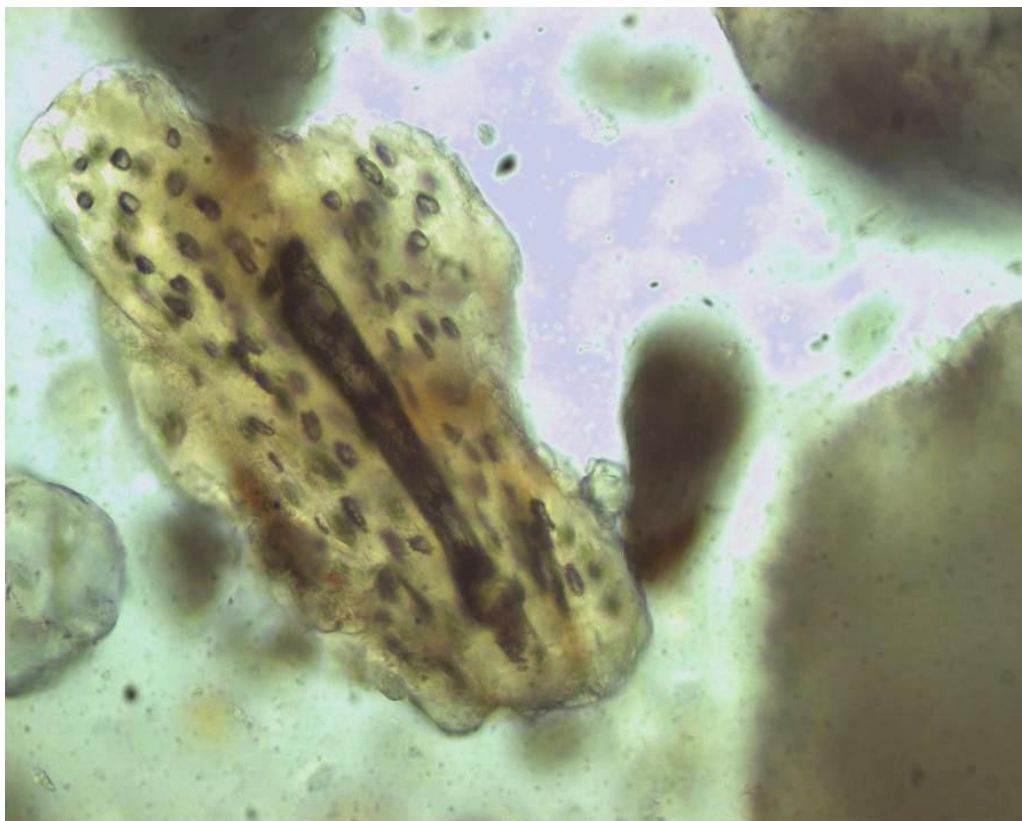
Fot. 56. Obraz mikroskopowy kości drobiowej (200x).



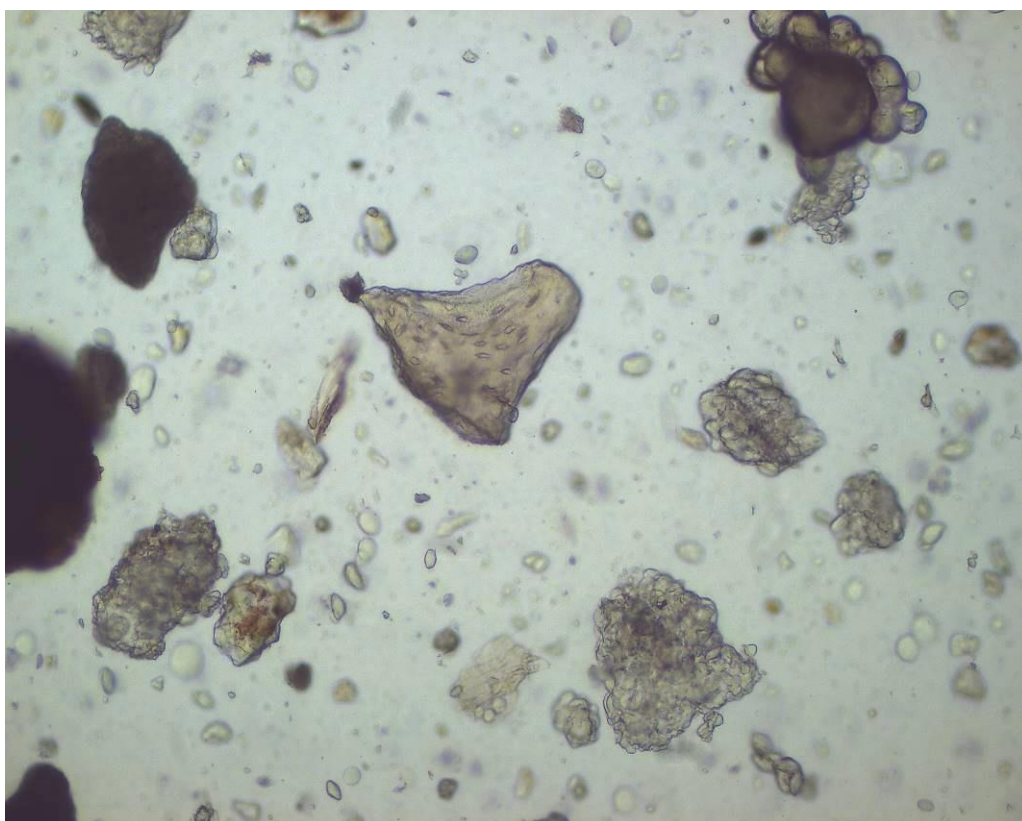
Fot. 57. Poduszki powietrzne w kościach drobiowych widoczne jako liczne, wąskie, podłużne rurki (50x).



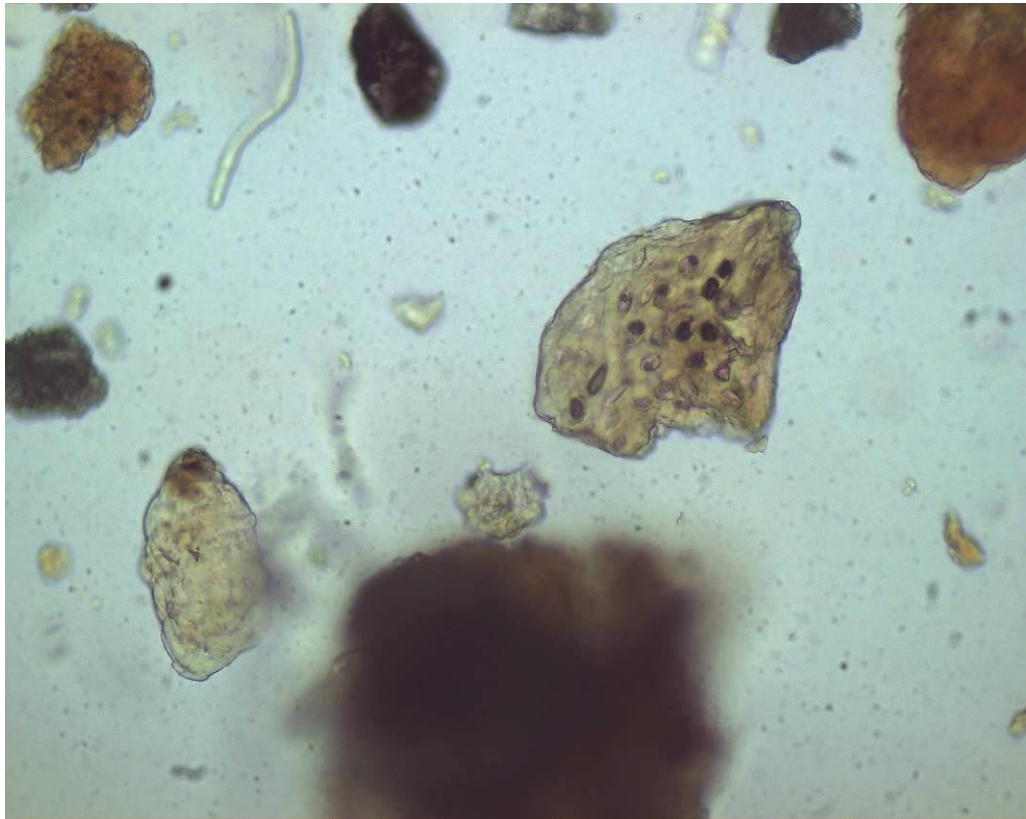
Fot. 58. Obraz mikroskopowy kości drobiowej (100x).



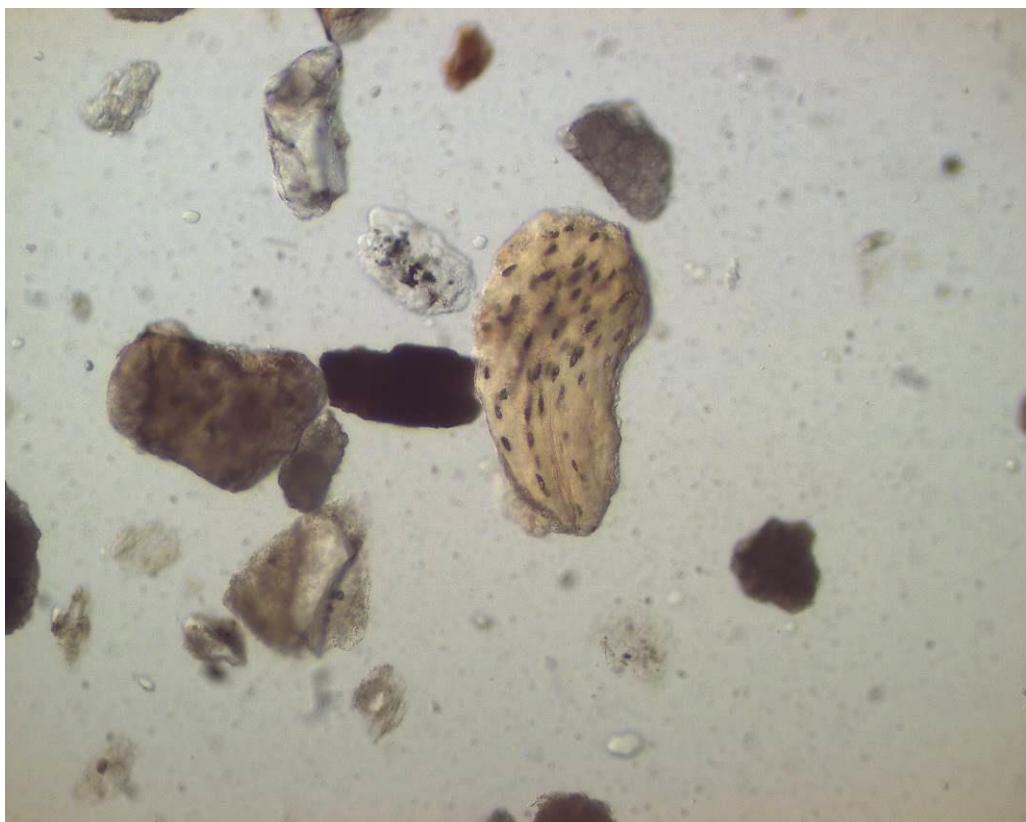
Fot. 59. Obraz mikroskopowy kości drobiowej w osadzie mieszanki paszowej (200x).



Fot. 60. Obraz mikroskopowy kości w osadzie mieszanki paszowej (100x).

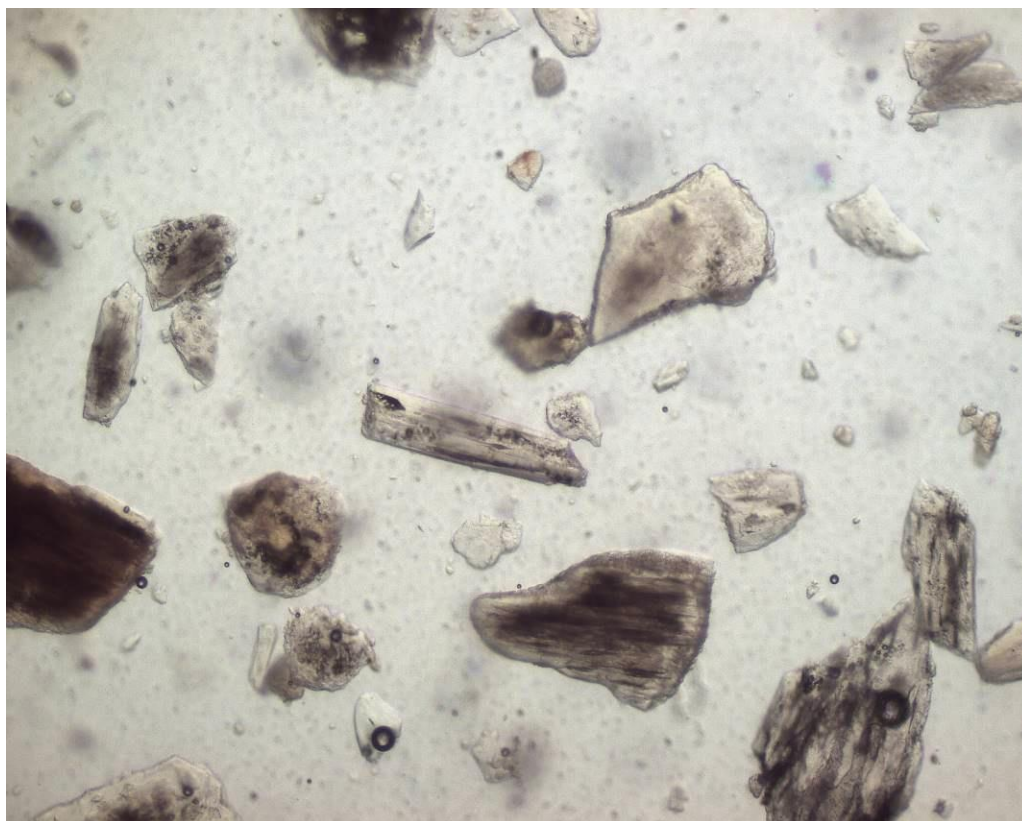


Fot. 61. Obraz mikroskopowy kości w osadzie mieszanki paszowej (100x).

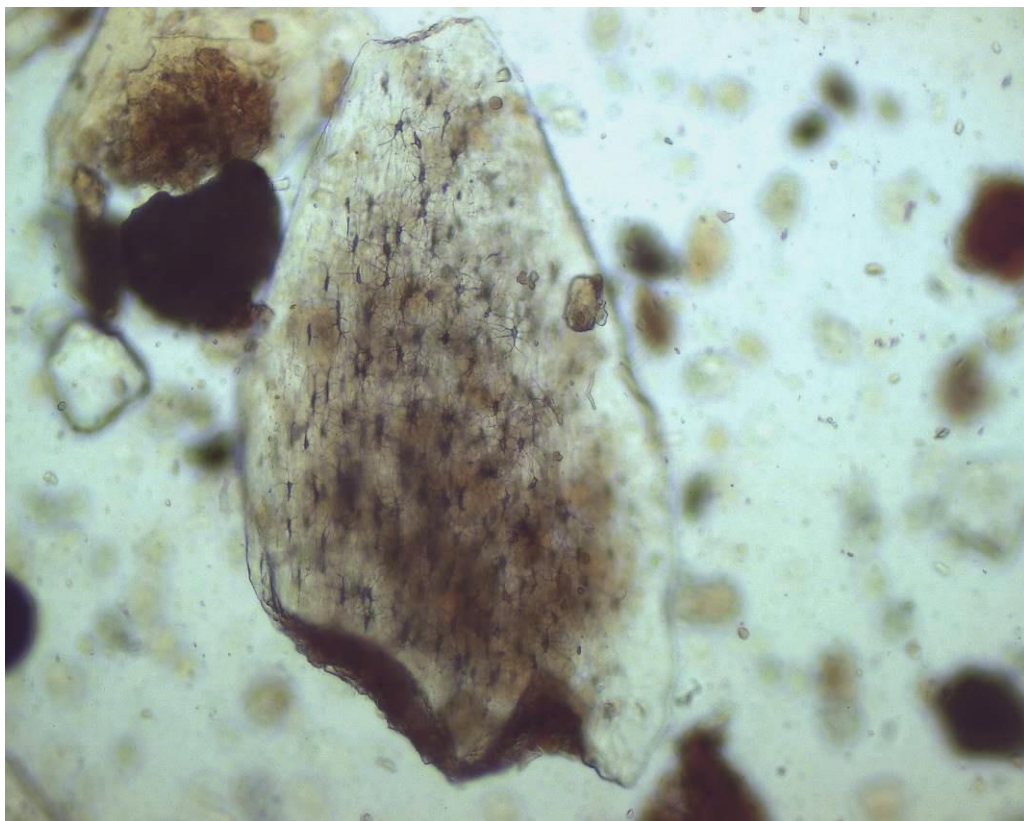


Fot. 62. Obraz mikroskopowy kości w osadzie mieszanki paszowej (100x).

Jamki kostne w ościach mają kształt wydłużony, wrzecionowaty z zazwyczaj bardzo dobrze widocznymi kanalikami kostnymi (Fot. 63-70). W przypadku niektórych gatunków ryb, np. śledzia, jamki kostne mają kształt liniowy bez widocznych kanalików. Z kolei w przypadku dużych ryb, np. tołpyga, jamki kostne mają kształt bardziej zaokrąglony ale kanaliki kostne są bardziej widoczne i licznie rozgałęzione niż w przypadku kości ssaków.



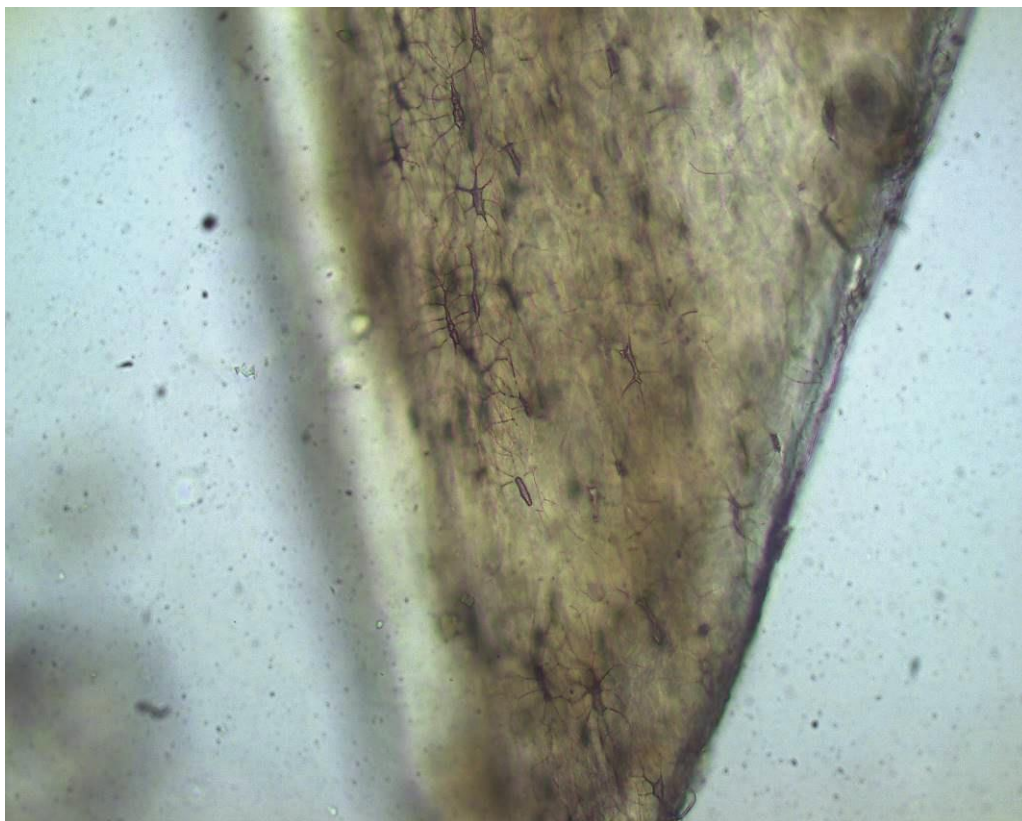
Fot. 63. Obraz mikroskopowy ości ryb (100x).



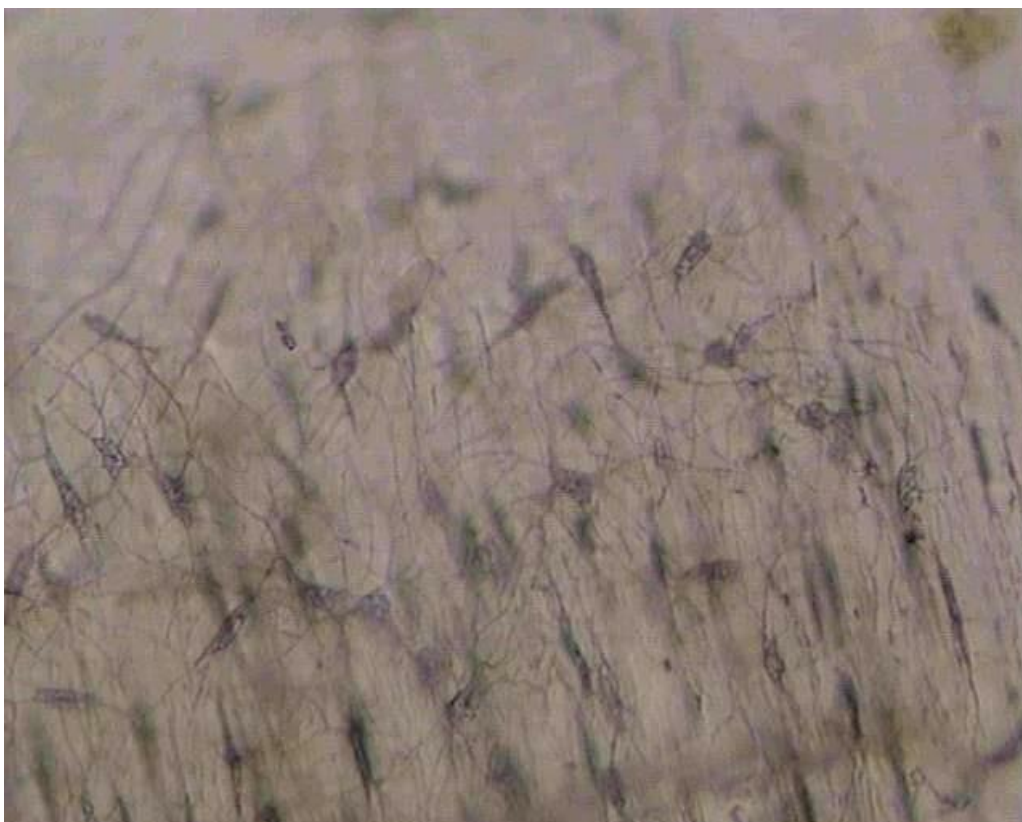
Fot. 64. Obraz mikroskopowy ości ryb (100x).



Fot. 65. Widoczny wydłużony kształt jamek kostnych ości łososia (200x).



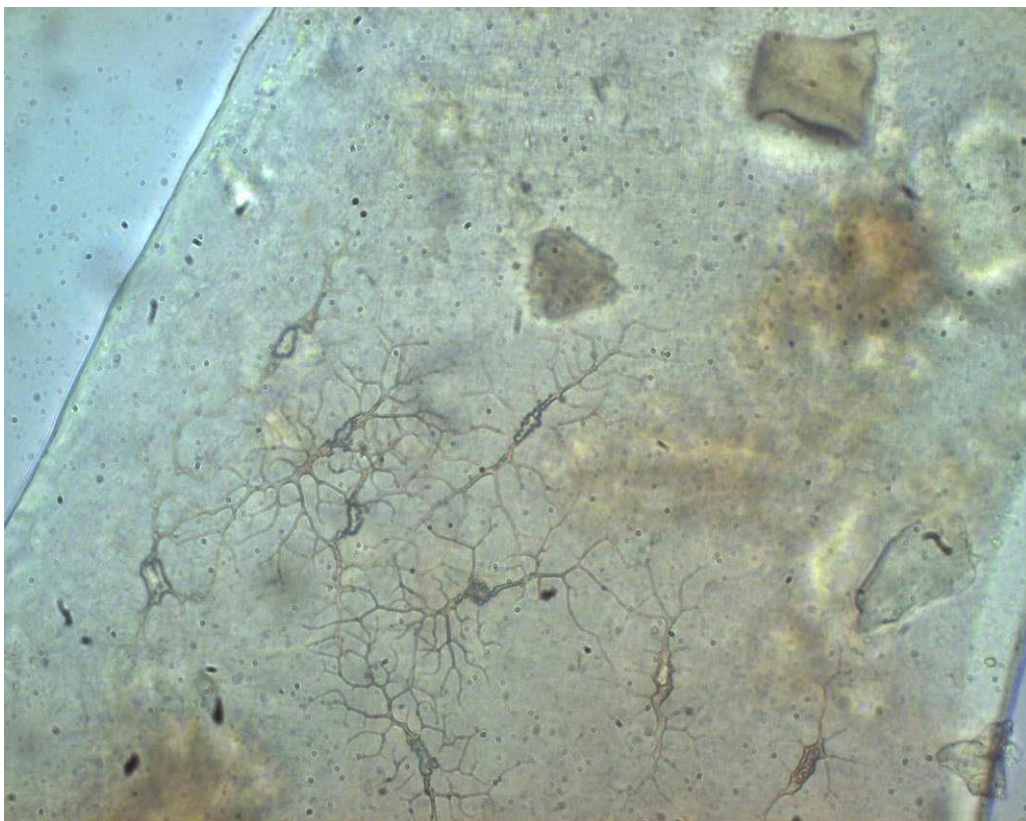
Fot. 66. Widoczny wydłużony kształt jamek kostnych z licznymi, rozgałęzionymi kanalikami kostnymi ości (200x).



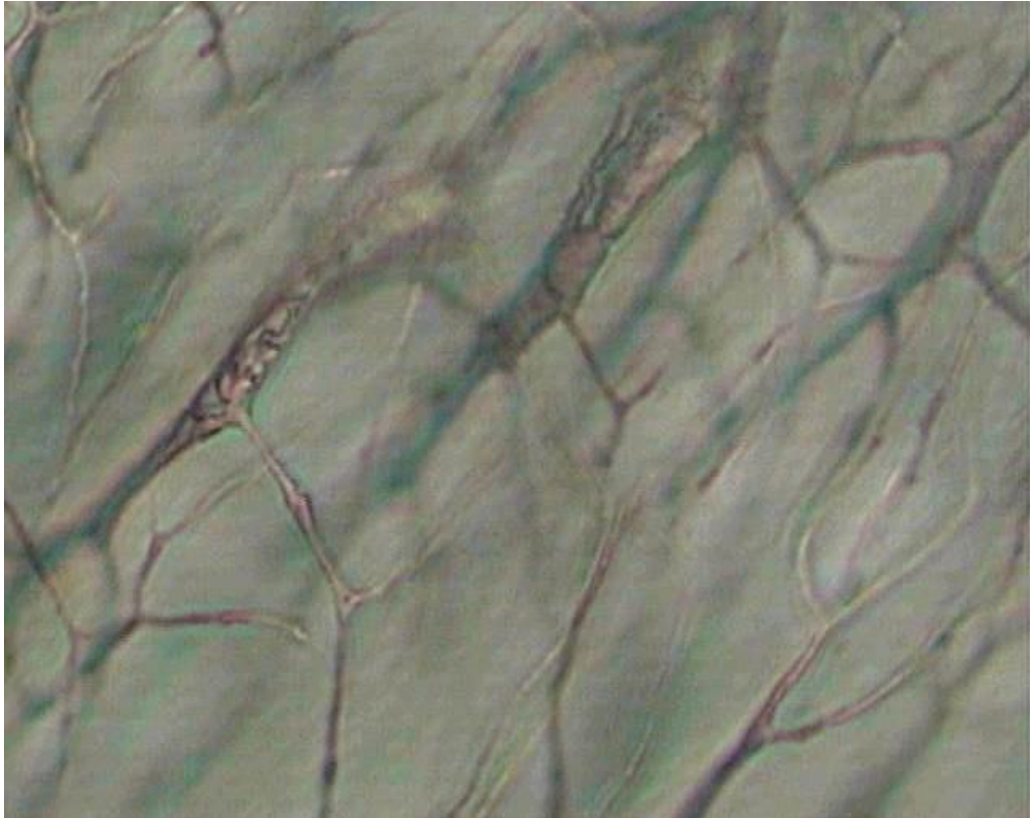
Fot. 67. Obraz mikroskopowy wydłużonych jamek kostnych ości łososia (200x).



Fot. 68. Obraz mikroskopowy jamiek kostnych ości (200x).

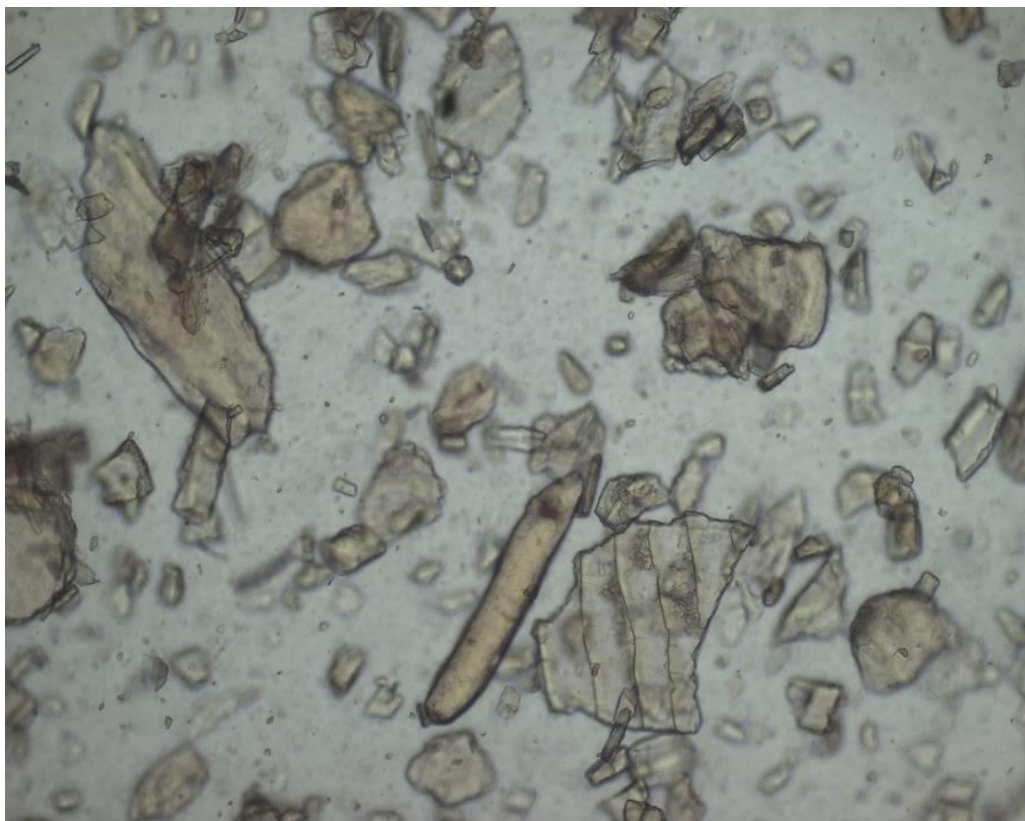


Fot. 69. Obraz mikroskopowy jamiek kostnych w ości ryby (400x).

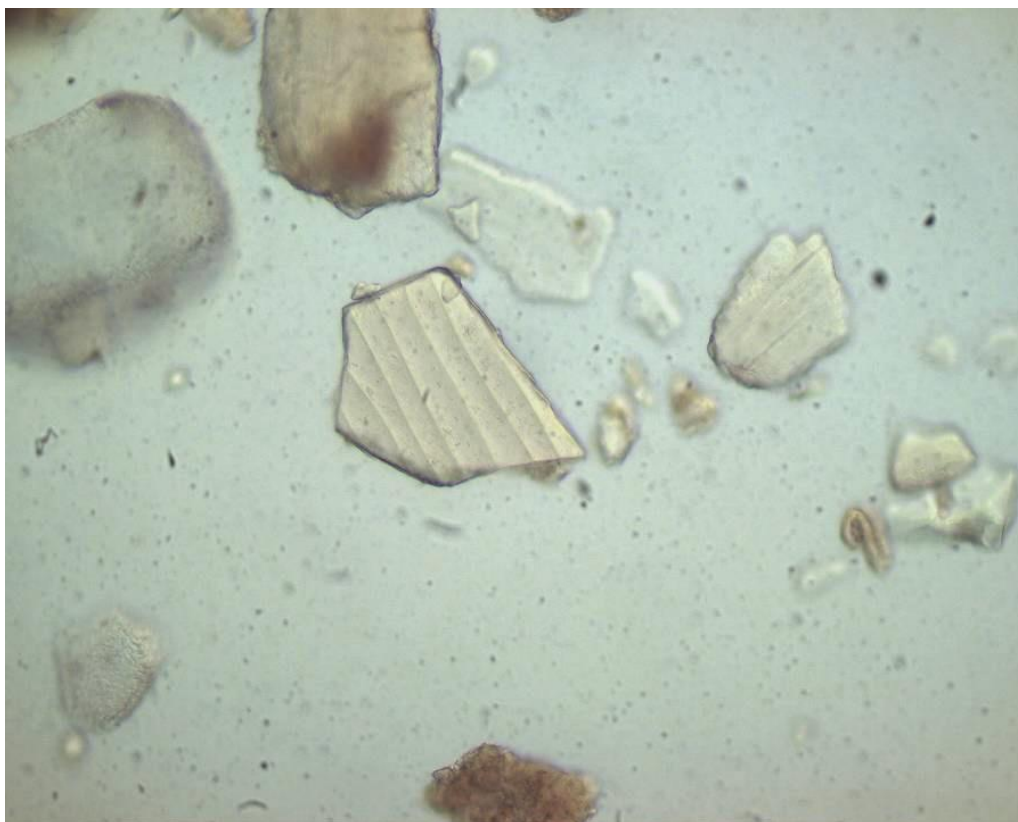


Fot. 70. Obraz mikroskopowy jamiek kostnych w ości ryby (1000x).

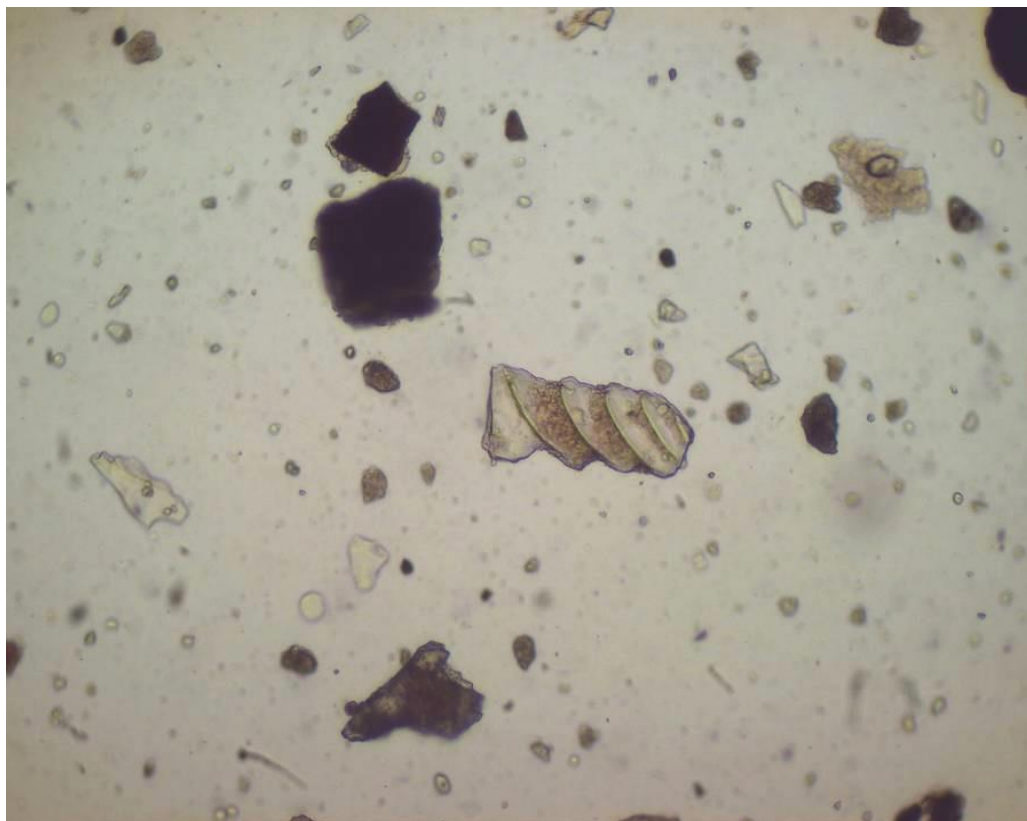
Łuski rybie są rozpoznawane w obrazie mikroskopowym jako różnej wielkości płytki, koloru kremowego, mlecznego z widocznymi równoległe biegnącymi liniami na całej powierzchni (Fot. 71-76).



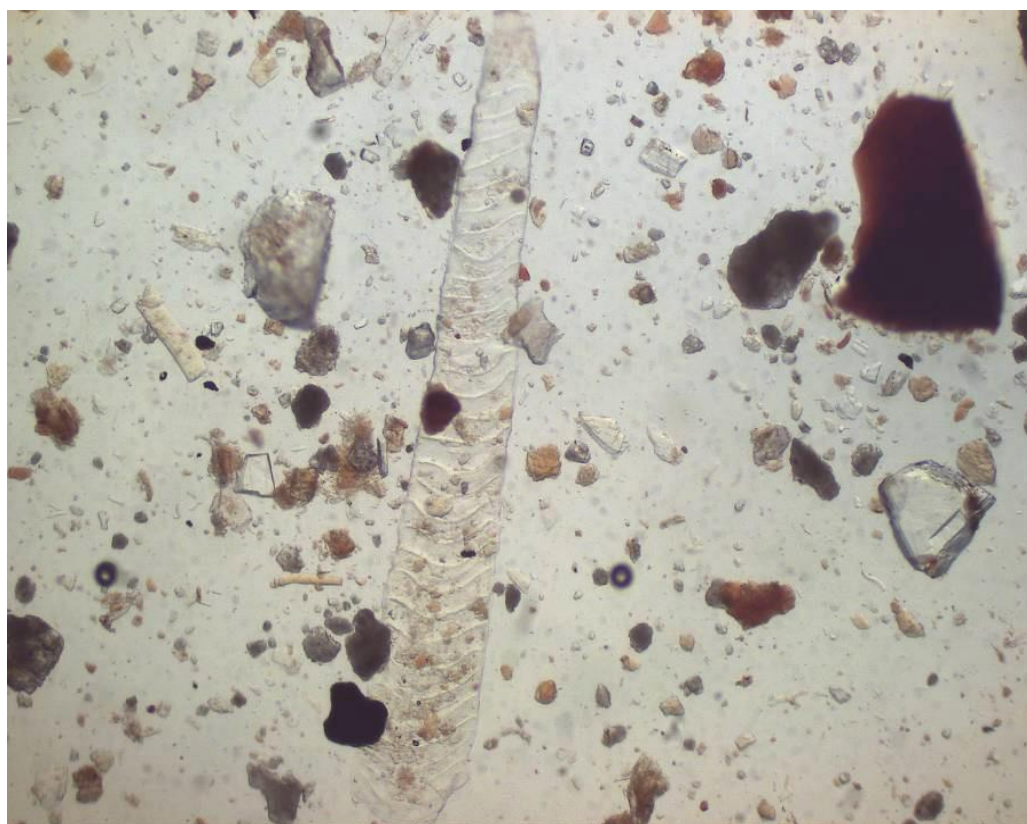
Fot. 71. Obraz mikroskopowy osadu mączki rybnej (100x).



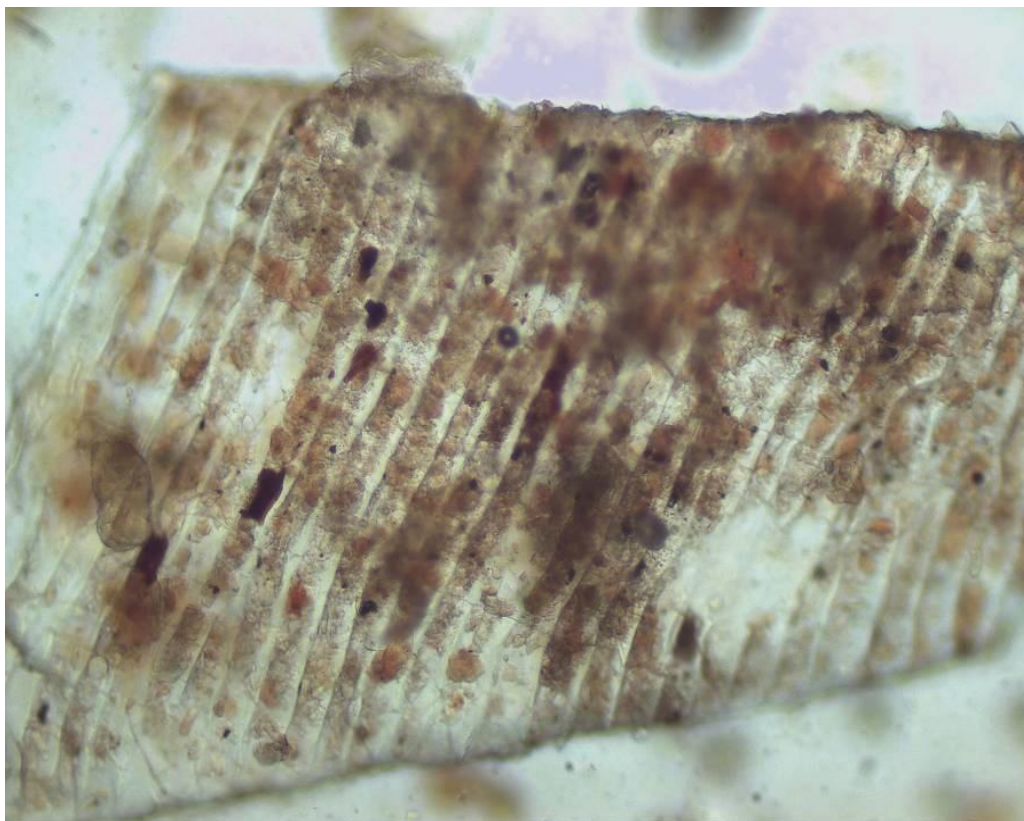
Fot. 72. Obraz mikroskopowy łusek (100x).



Fot. 73. Obraz mikroskopowy łusek (100x).



Fot. 74. Obraz mikroskopowy łuski (100x).

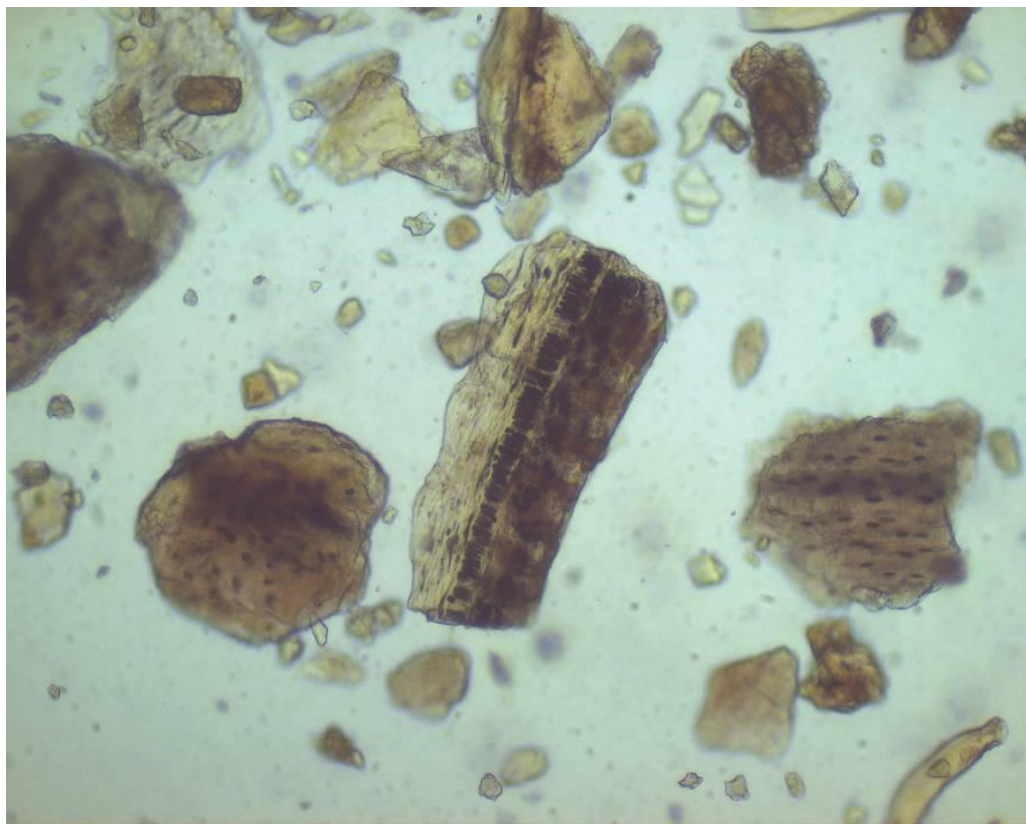


Fot. 75. Obraz mikroskopowy łuski (200x).

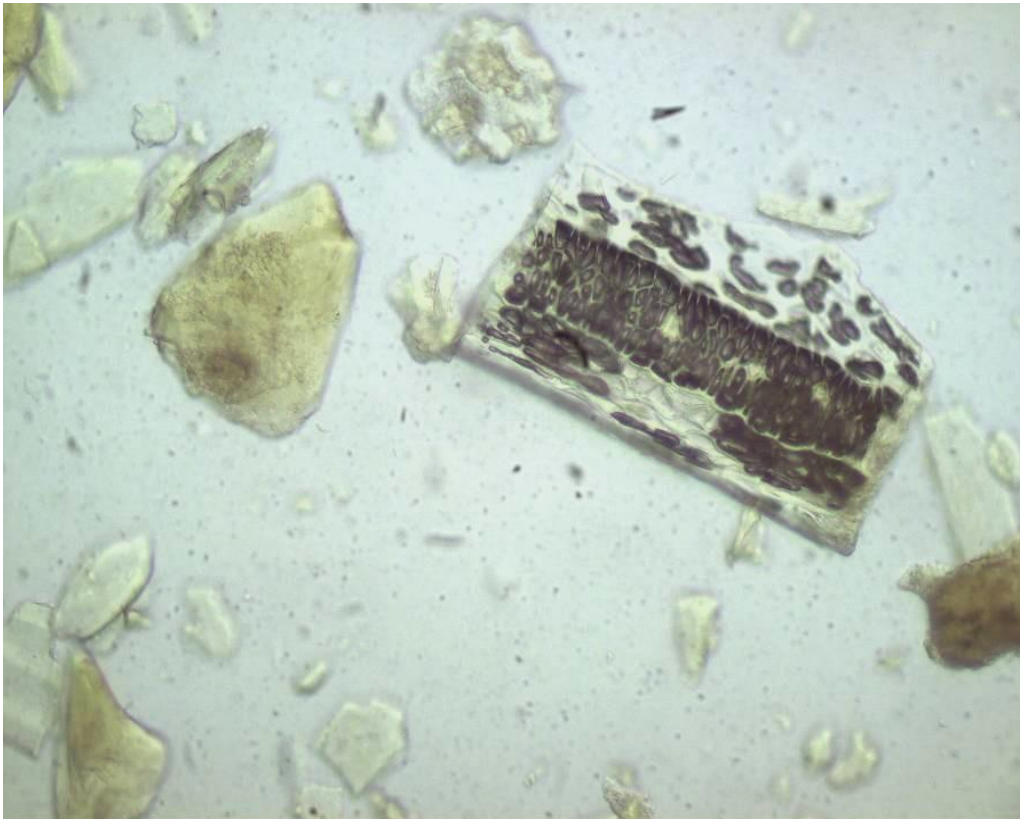


Fot. 76. Obraz mikroskopowy fragmentu łuski (200x).

Charakterystycznym elementem dla mączki rybnej są także fragmenty skrzeli ryb, które możemy stwierdzić podczas obserwacji osadu z olejem parafinowym/glicerolem (Fot. 77-79).



Fot. 77. Obraz mikroskopowy skrzela (100x).



Fot. 78. Obraz mikroskopowy skrzela (200x).

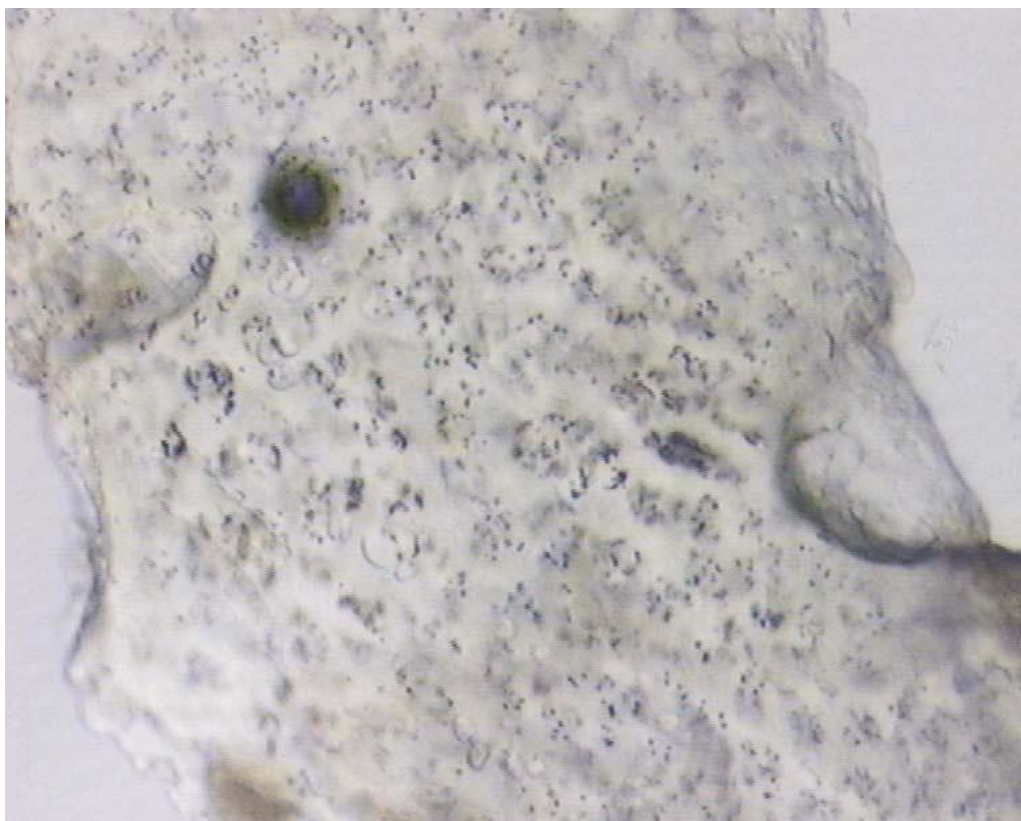


Fot. 79. Obraz mikroskopowy skrzela (200x).

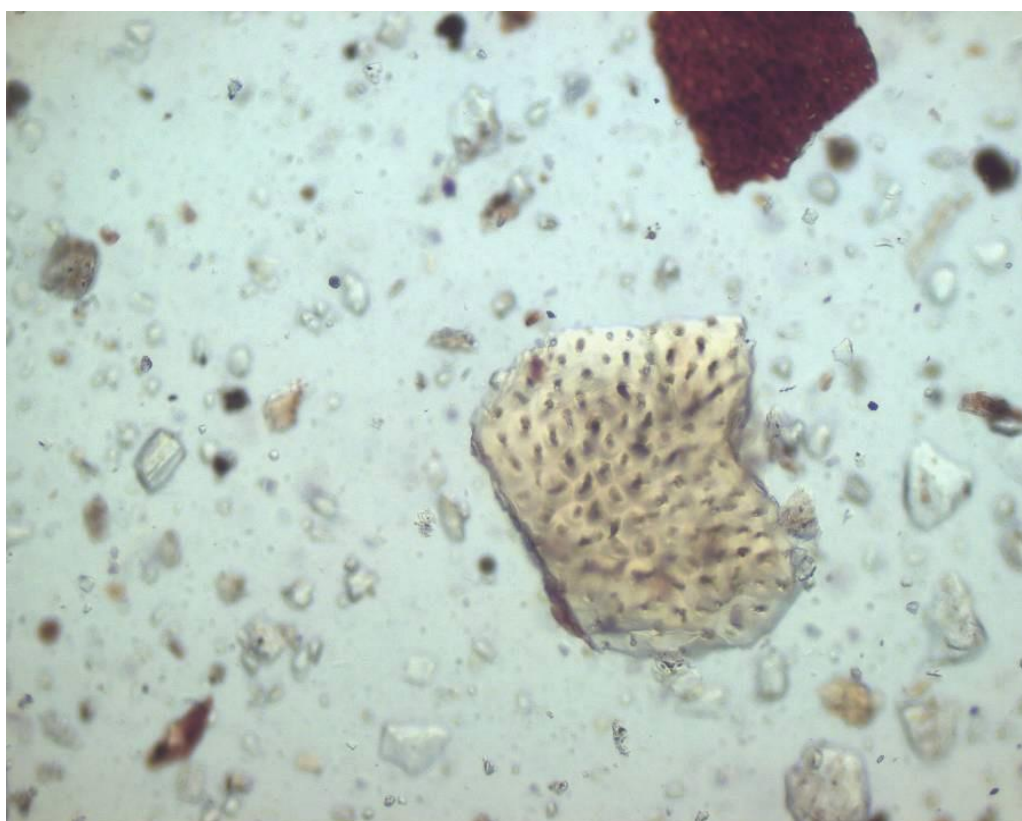
Obraz mikroskopowy chrząstek charakteryzuje się występowaniem okrągłych komórek (chondrocytów), które ułożone są w zespoły po dwie lub trzy komórki otoczone torebką włókien kolagenowych (chondronem) w istocie międzykomórkowej. Ze względu na fakt, że odżywanie chrząstek w żywym organizmie odbywa się przez dyfuzję, nie posiadają one systemu kanalików. Odróżnienie chrząstki pochodzących z ssaków od drobiu jest bardzo utrudnione. Natomiast chrząstki ryb są bardziej odmienne pod względem kształtu i wyglądu chondrocytów (Fot. 80-82).



Fot. 80. Zdjęcie materiału chrzęstnego rybnego. Charakterystyczny wygląd chondrocytów, powiększenie 100x.



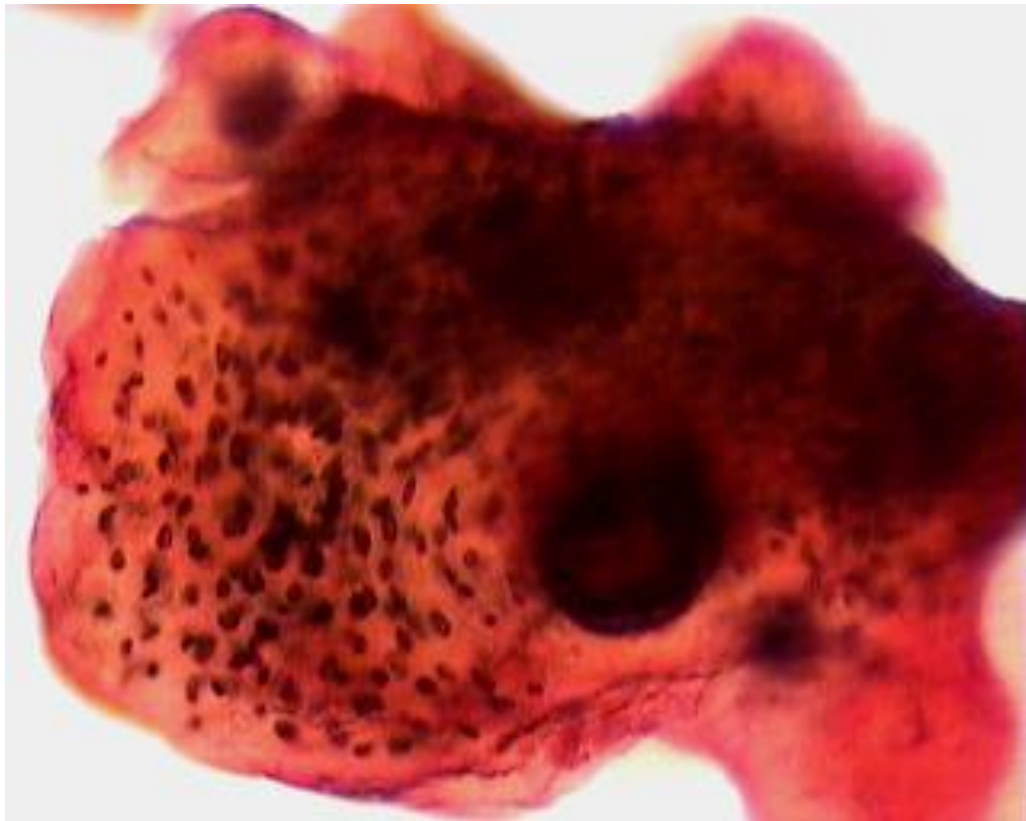
Fot. 81. Zdjęcie materiału chrzęstnego drobiowego. Widoczne skupiska kulistych jamek. Mikroskop biologiczny, powiększenie 200x.



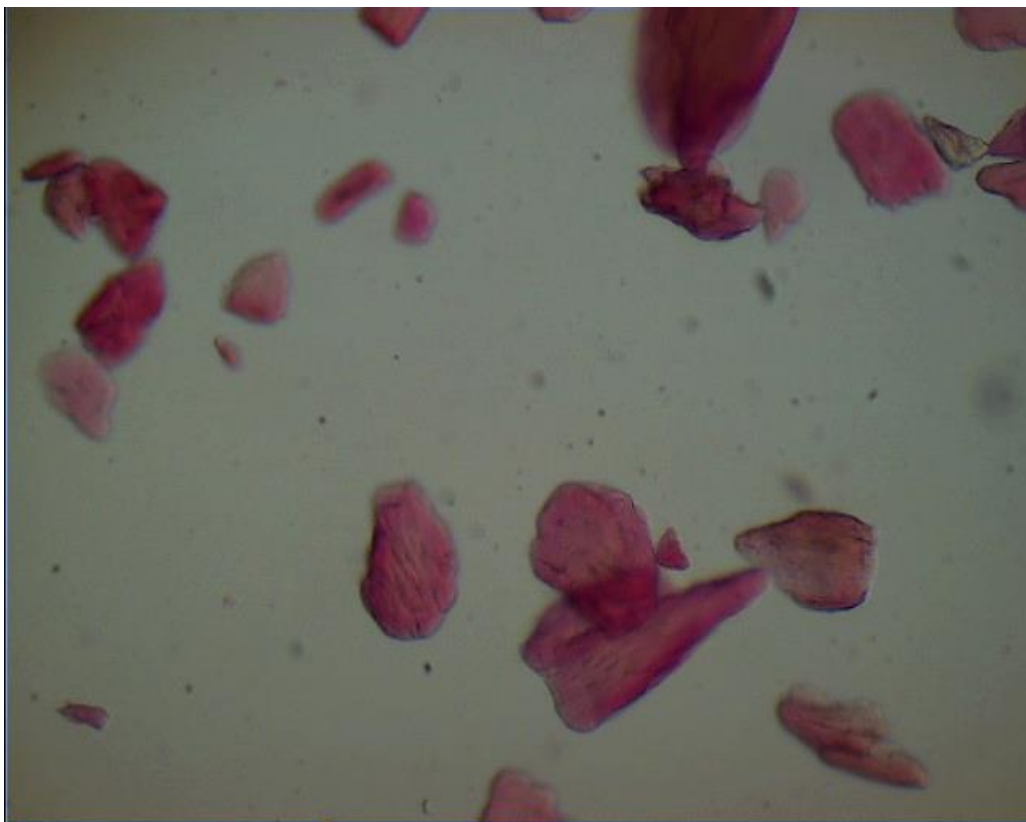
Fot. 82. Obraz mikroskopowy fragmentu chrząstki (100x).

Celem usprawnienia wykrywania składników kostnych można stosować odczynnik barwiący – czerwień alizarynową. Wysuszony osad należy przenieść do szklanej probówki, następnie płukać dwukrotnie etanolem. W kolejnym etapie należy wybielić przy użyciu podchlorynu sodu. Po dwukrotnym płukaniu wodą należy dodać 2-10 kropli roztworu czerwieni alizarynowej. Po ok. 30 s należy wypłukać zabarwiony osad etanolem, acetonem. Następnie wybarwiony osad należy pozostawić do wysuszenia. Składniki kostne należy również badać przy użyciu odczynnika osadzającego (olej parafinowy, glicerol) i mikroskopu biologicznego. Zastosowanie powiększeń w zakresie od 100 do 400x, pozwala na bardziej precyzyjne rozpoznawanie składników mineralnych, ponieważ niektóre z nich również wybarwiają się na kolor różowy i przy powiększeniach w zakresie od 40 do 100x mają strukturę zbliżoną do składników kostnych. Do badania wykorzystywany jest odczynnik osadzający (olej parafinowy). Wybarwione składniki kostne są identyfikowane na podstawie obecności jamek kostnych wypełnionych powietrzem i widocznych w postaci otworów o średnicy 1-5 μm . W przypadku wybarwionych fragmentów kostnych należy zwrócić uwagę na szybsze wypełnianie się jamek kostnych olejem parafinowym, przez co identyfikacja jest znacznie utrudniona. Ponadto w przypadku mącek rybnych stosowanie tego odczynnika jest mniej przydatne, gdyż cały osad wybarwia się na kolor czerwono-różowy.

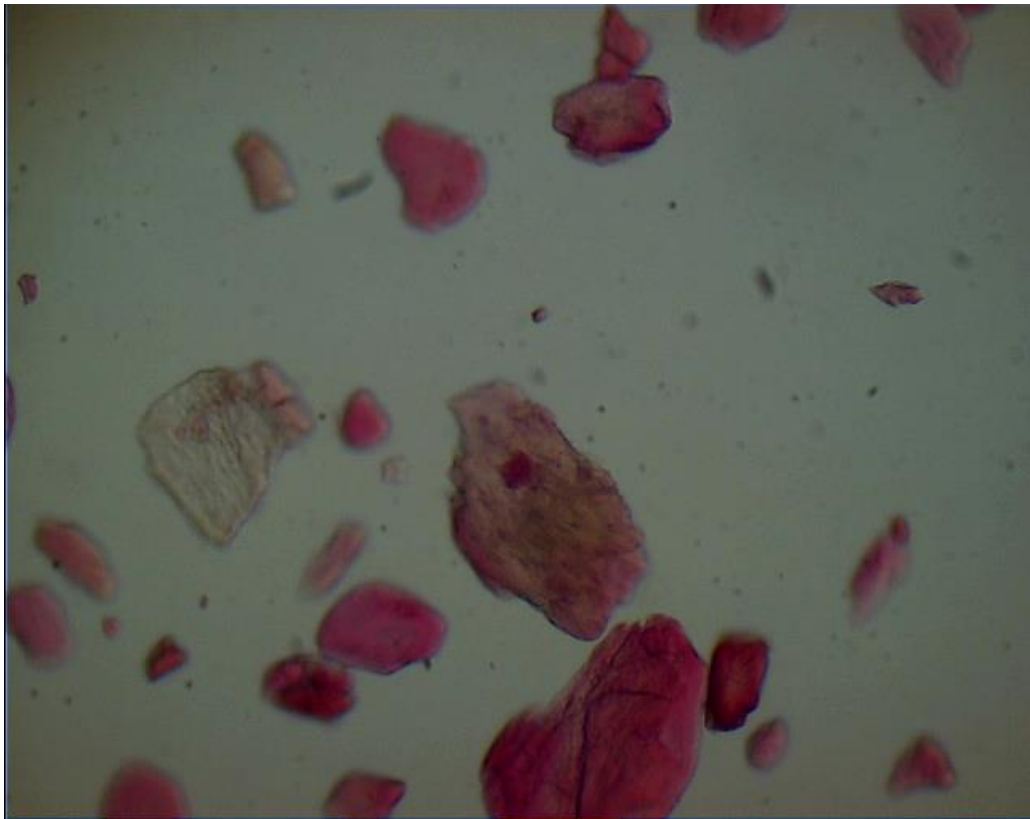
Na Fot. 83-89 widoczne są składniki kostne wybarwione na kolor czerwono-różowy.



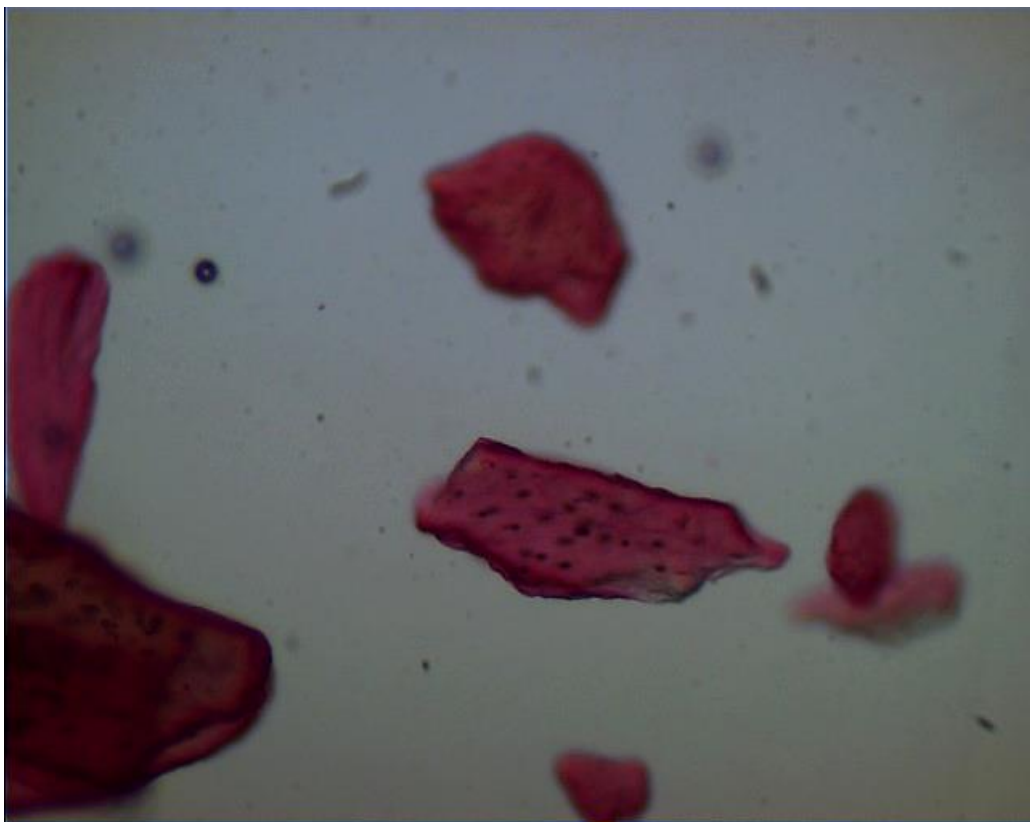
Fot. 83. Obraz mikroskopowy fragmentu kości wybarwionego czerwienią alizarynową, powiększenie 200x.



Fot. 84. Obraz mikroskopowy osadu mączki rybnej wybarwionego czerwienią alizarynową (100x).



Fot. 85. Podczas barwienia nie wszystkie kości wybarwiają się czerwienią alizarynową (100x).



Fot. 86. Obraz mikroskopowy fragmentu kości wybarwionego czerwienią alizarynową (100x).



Fot. 87. Obraz mikroskopowy fragmentu kości drobiowej wybarwionego czerwienią alizarynową (200x).

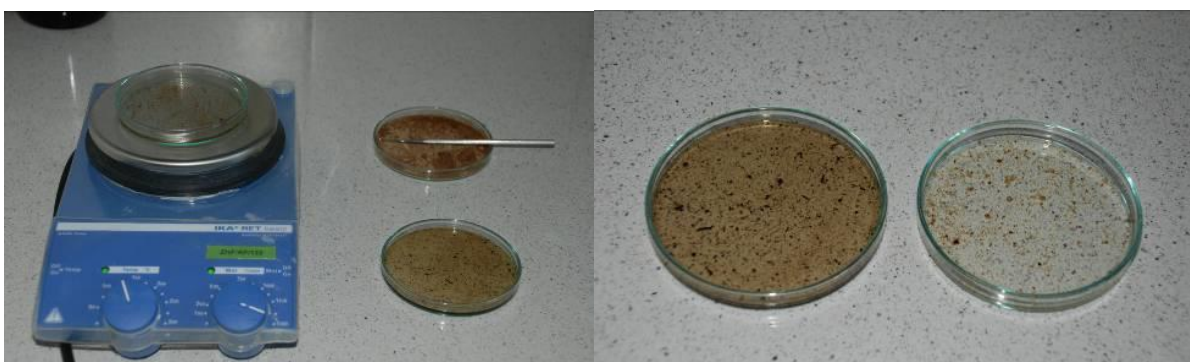


Fot. 88. Obraz mikroskopowy fragmentu łuski wybarwionej czerwienią alizarynową (100x).

4. 2. Identyfikacja składników pochodzenia zwierzęcego we flotacie.

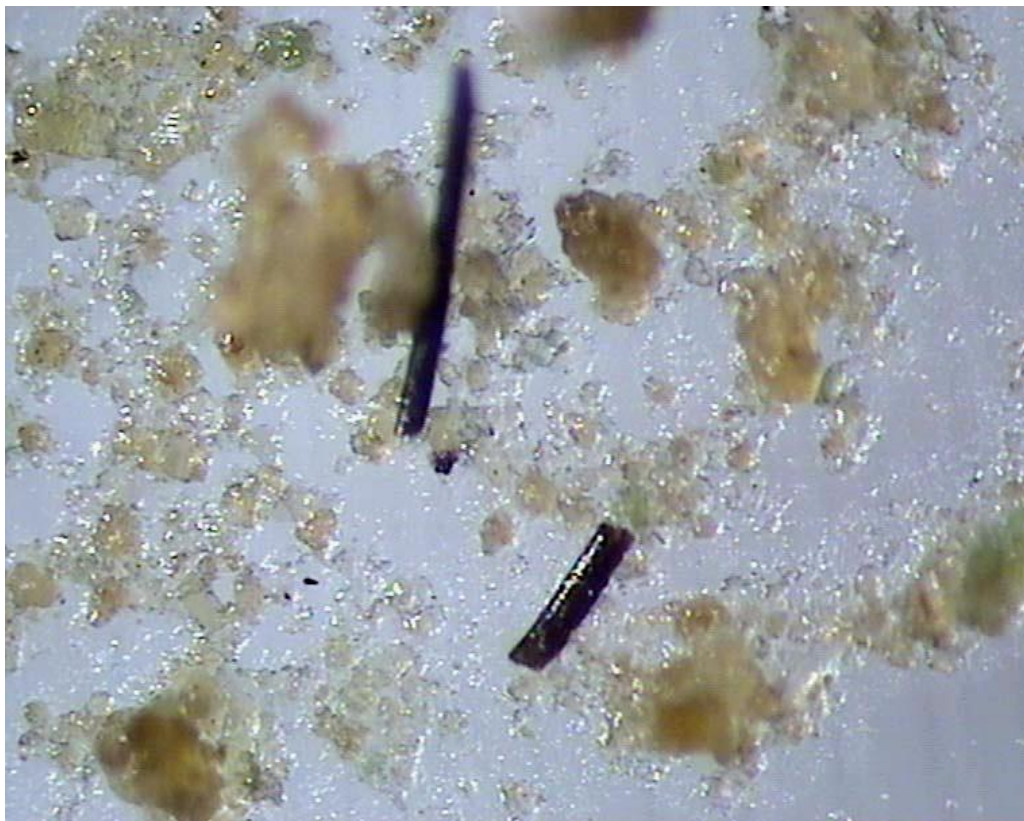
Badanie flotatu wykonywane jest przy użyciu mikroskopu stereoskopowego i biologicznego. W celu wykrycia składników pochodzenia zwierzęcego zawierających można stosować odczynnik cystynowy, roztwór jodu w jodku potasu oraz mieszaninę tetrametylbenzyny z 3% nadtlenkiem wodoru (4:1).

Po ostrożnym podgrzaniu niewielkiej ilości próbki pobranej z flotatu na płytkę Petriego z odczynnikiem cystynowym elementy zawierające cystynę (włosy, pióra) wybarwiają się na kolor brązowo-czarny (Fot. 89). Włosy są widoczne w postaci czarnych, różnej średnicy walców o połyskującej powierzchni (Fot. 90-93).



Fot. 89. Ogrzewanie flotatu próbek z odczynnikiem cystynowym. Widoczna różnica zabarwienia przed i po podgrzaniu.

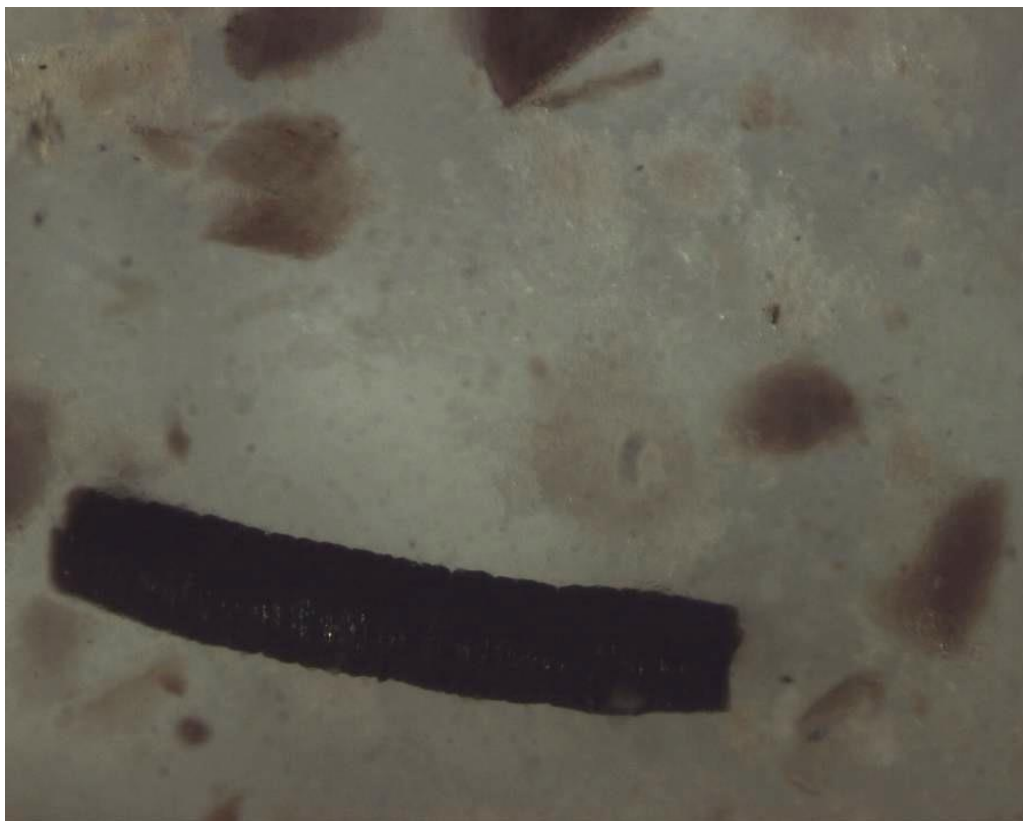
Fragmenty piór zabarwione odczynnikiem cystynowym mają kolor od jasno do ciemno brązowego, z charakterystycznym prążkowaniem (dobrze widocznym w przypadku promyków i promieni). Na Fot. 94-100 przedstawiono najbardziej typowe obrazy fragmentów piór.



Fot. 90. Po ostrożnym podgrzaniu próbki odczynnik cystynowy wybarwia włos na kolor czarny, powiększenie 40x.



Fot. 91. Obraz mikroskopowy fragmentu włosa wybarwionego na kolor czarny odczynnikiem cystynowym (50x).



Fot. 92. Fragment włosa wybarwiony na kolor czarny odczynnikiem cystynowym (50x).



Fot. 93. Obraz mikroskopowy włosa wybarwionego odczynnikiem cystynowym, powiększenie 25x.



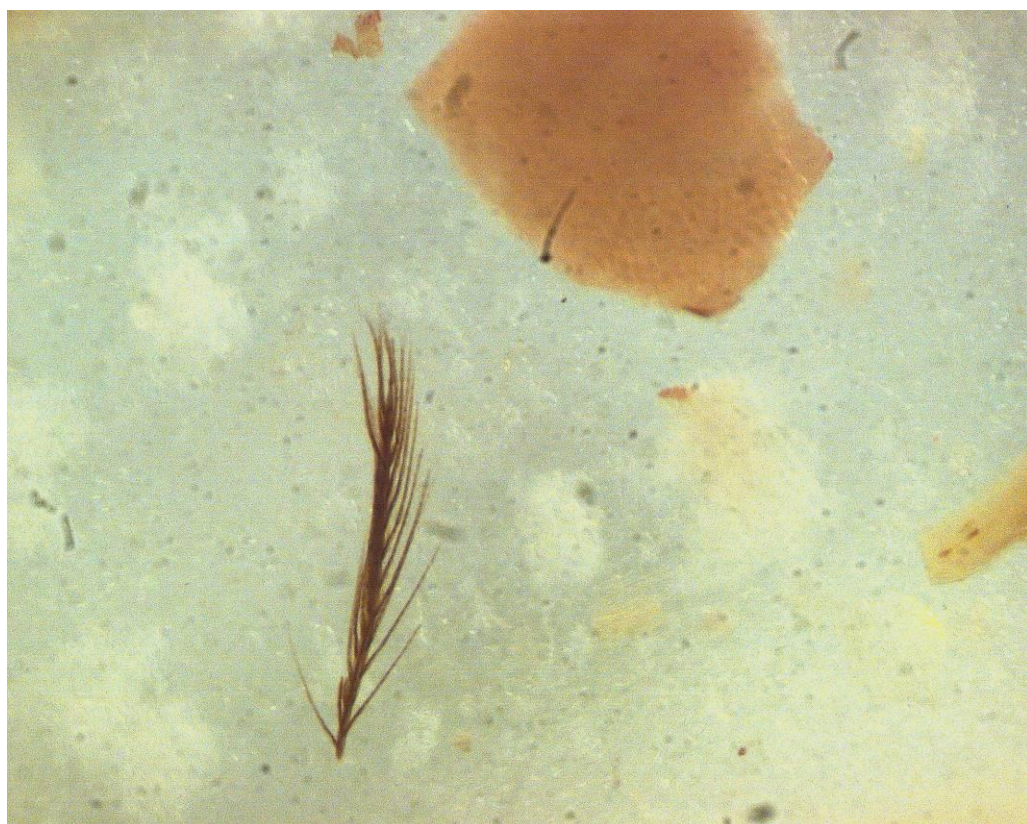
Fot. 94. Obraz mikroskopowy fragmentu pióra wybarwionego odczynnikiem cystynowym (30x).



Fot. 95. Wybarwiony odczynnikiem cystynowym fragment pióra z widocznymi promykami, powiększenie 40x.



Fot. 96. Wybarwiony fragment pióra widoczny pod mikroskopem stereoskopowym, powiększenie 40x.



Fot. 97. Fragment pióra w badanej próbce paszy. Mikroskop stereoskopowy, powiększenie 40x.



Fot. 98. Fragment pióra w badanej próbce paszy. Mikroskop stereoskopowy, powiększenie 25x.



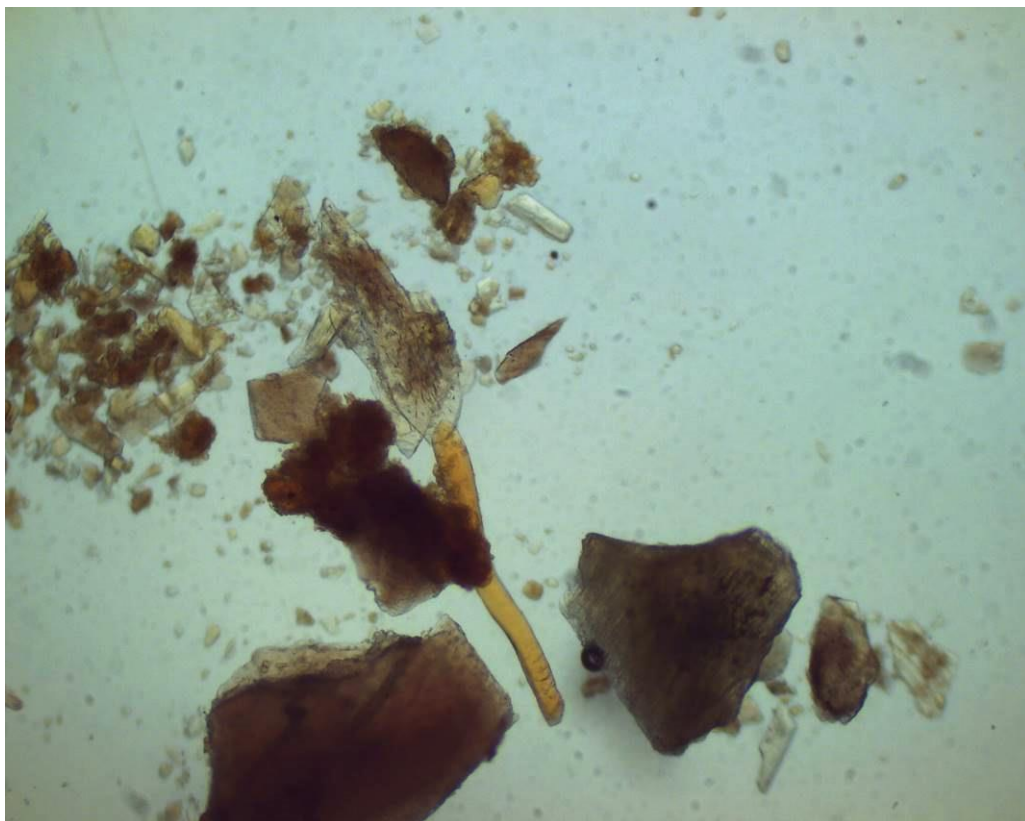
Fot. 99. Fragment pióra w badanej próbce paszy. Mikroskop stereoskopowy, powiększenie 25x.



Fot. 100. Fragment pióra w badanej próbce paszy. Mikroskop stereoskopowy, powiększenie 25x.

Tkanka mięśniowa (gładka i poprzecznie prążkowana) stanowi zazwyczaj dominujący surowiec w produkcji mączek mięsno-kostnych. W trakcie procesu przetwarzania typowa struktura ulega dezintegracji. Tkanka mięśniowa jest widoczna w postaci krótszych lub dłuższych fragmentów pojedynczych włókien mięśniowych (Fot. 101-103, 106). Prążki w mięśniach poprzecznie prążkowanych są dobrze widoczne przy powiększeniach nawet już 200x (Fot. 104, 105, 107). Włókna mięśniowe gładkie również są możliwe do rozpoznania (Fot. 108).

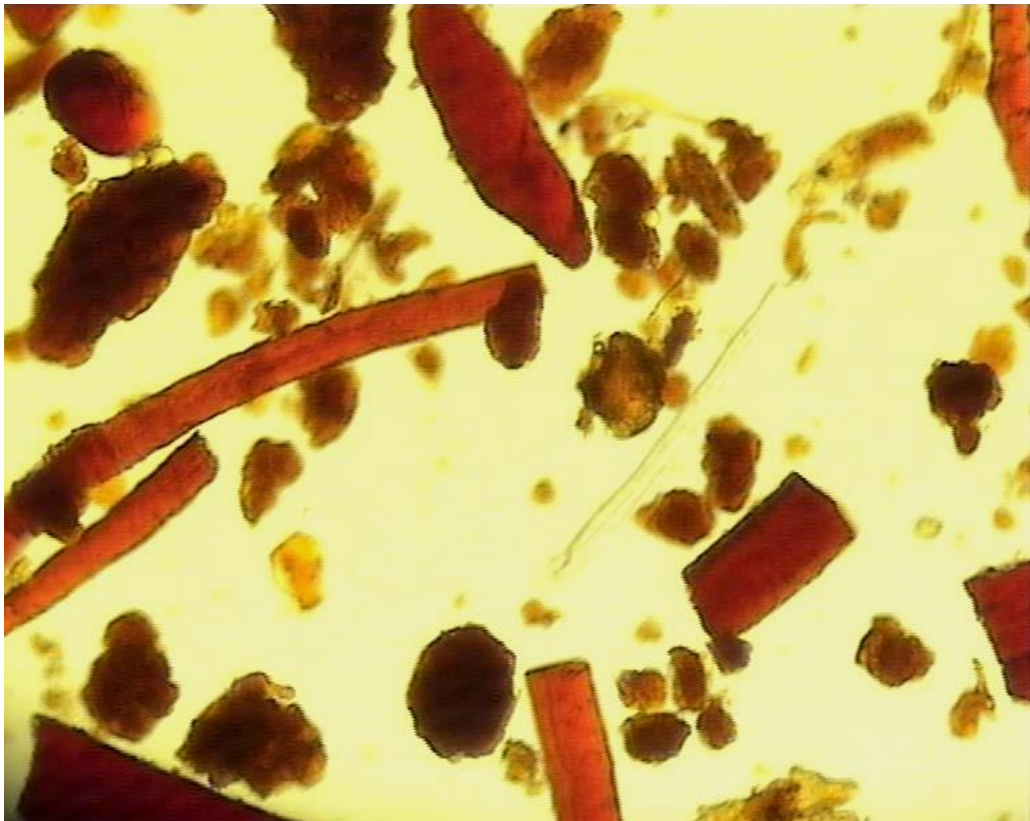
Wygląd włókien mięśniowych jest mało charakterystyczny gatunkowo i dlatego nie jest możliwe rozpoznanie, czy pochodzą one od ryb czy od zwierząt lądowych.



Fot. 101. Włókna mięśniowe wybarwione 3% roztworem jodyny (50x).



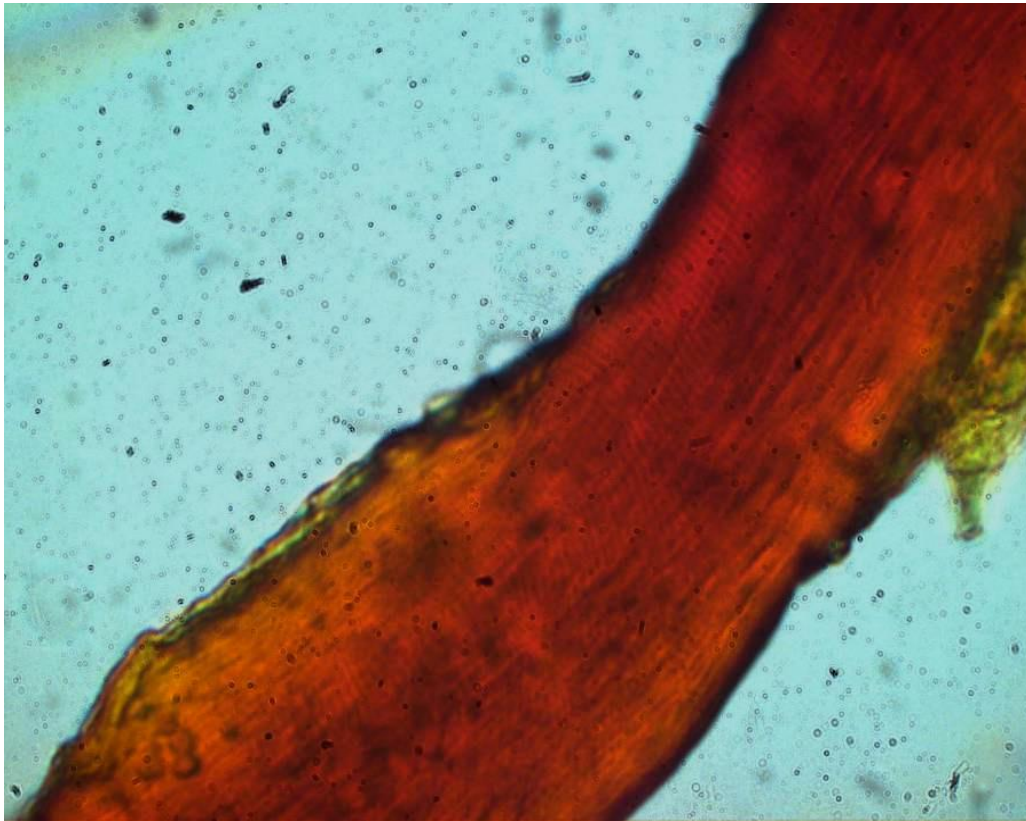
Fot. 102. Włókna mięśniowe wybarwione 3% roztworem jodyny (100x).



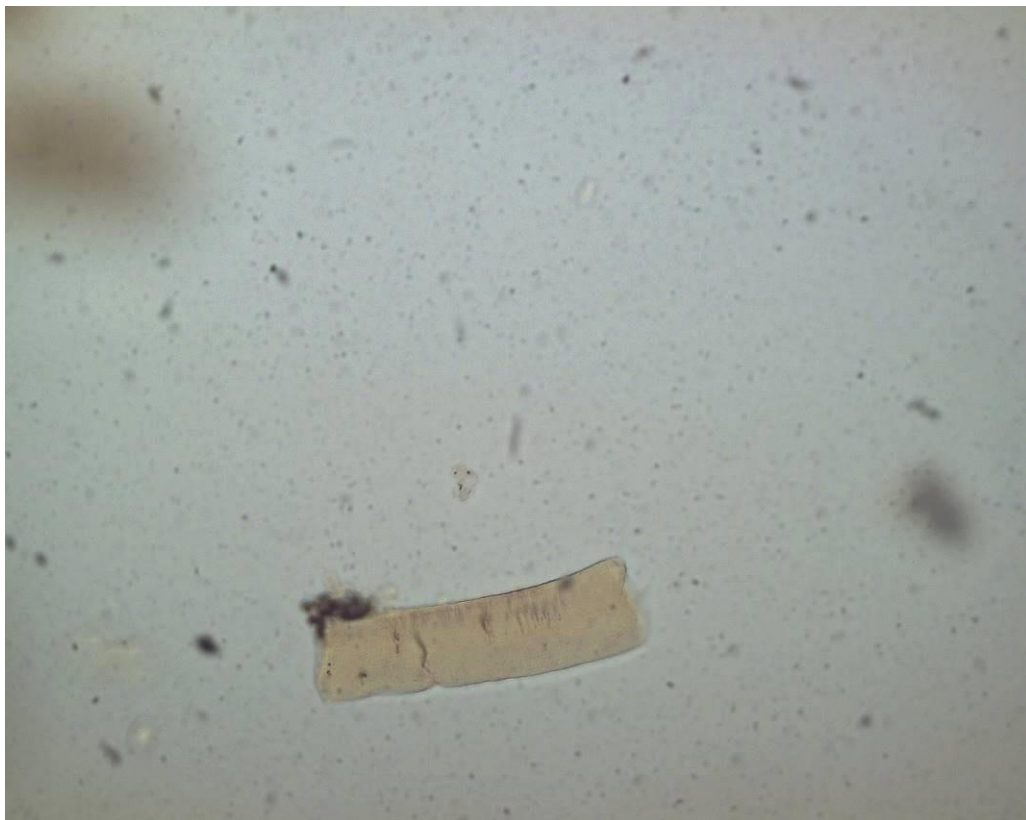
Fot. 103. Fragmenty włókien mięśniowych. Mikroskop biologiczny, powiększenie 100x.



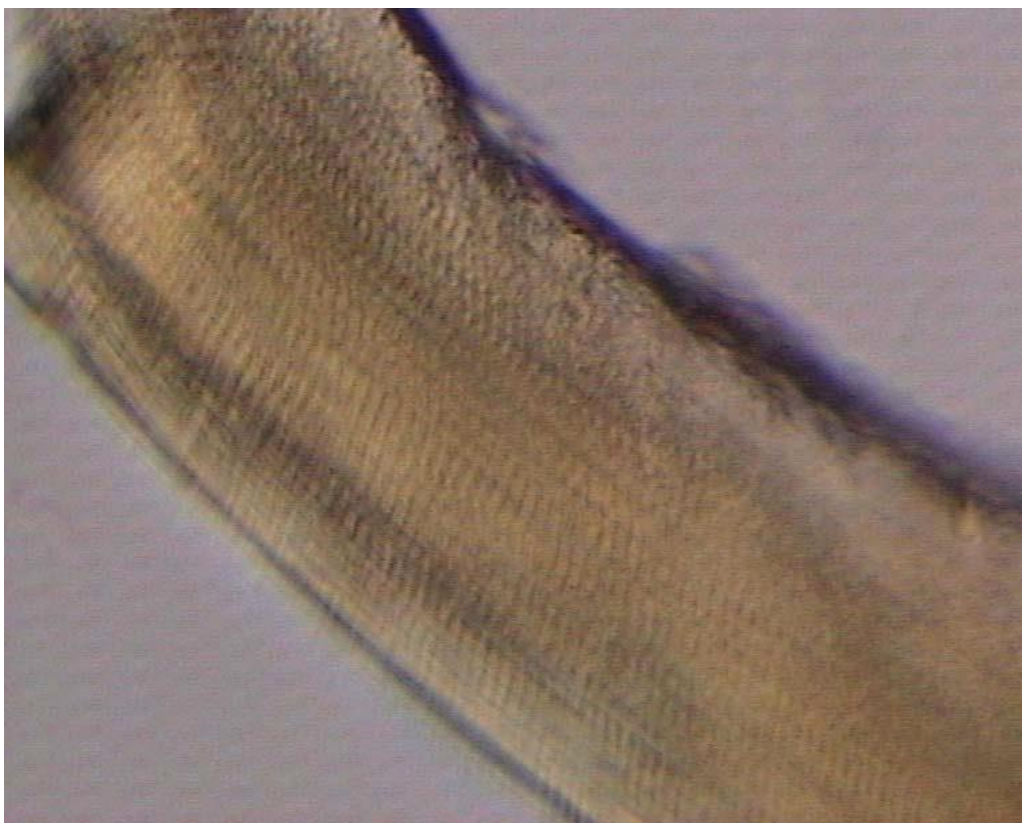
Fot. 104. Fragment mięśnia poprzecznie prążkowanego ryby przy powiększeniu 400x.



Fot. 105. Fragment mięśnia ryby przy powiększeniu 1000x. Dobrze widoczne poprzeczne prążkowanie.



Fot. 106. Fragment mięśnia ryby bez barwienia przy powiększeniu 100x.



Fot. 107. Fragment mięśnia ryby bez barwienia przy powiększeniu 400x. Dobrze widoczne poprzeczne prążkowanie.



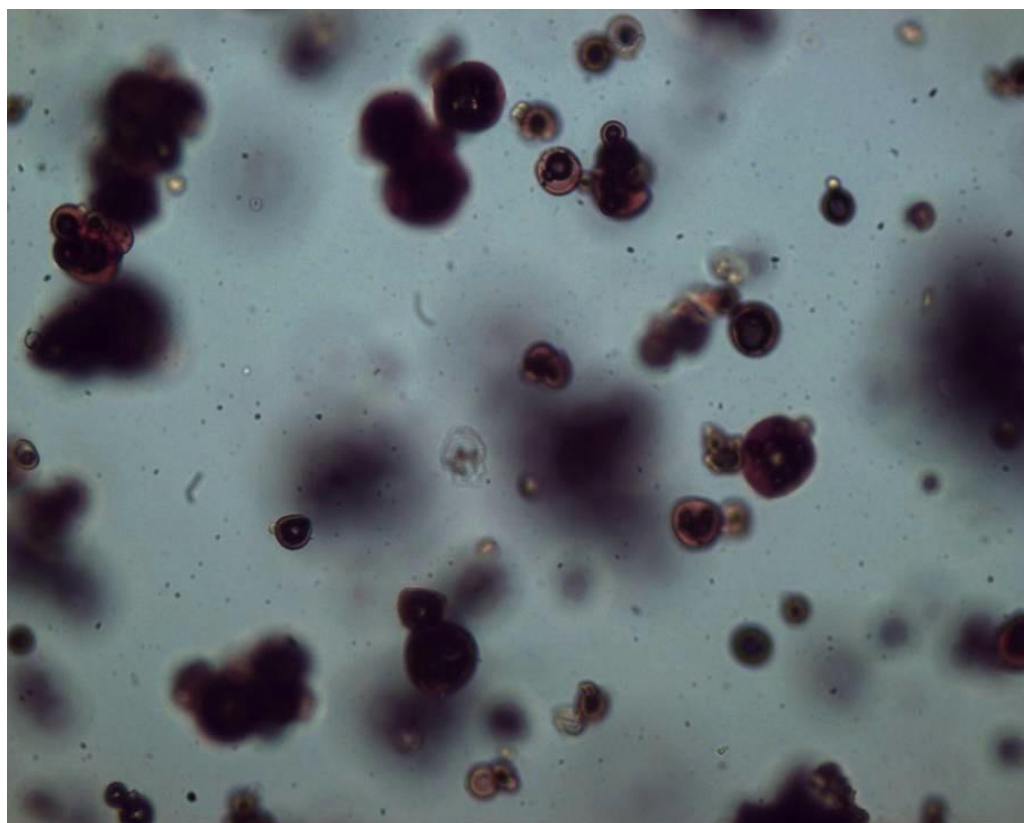
Fot. 108. Fragment mięśnia wołowego bez barwienia przy powiększeniu 400x.

4.3. Wykrywanie mączek z krwi i produktów z krwi.

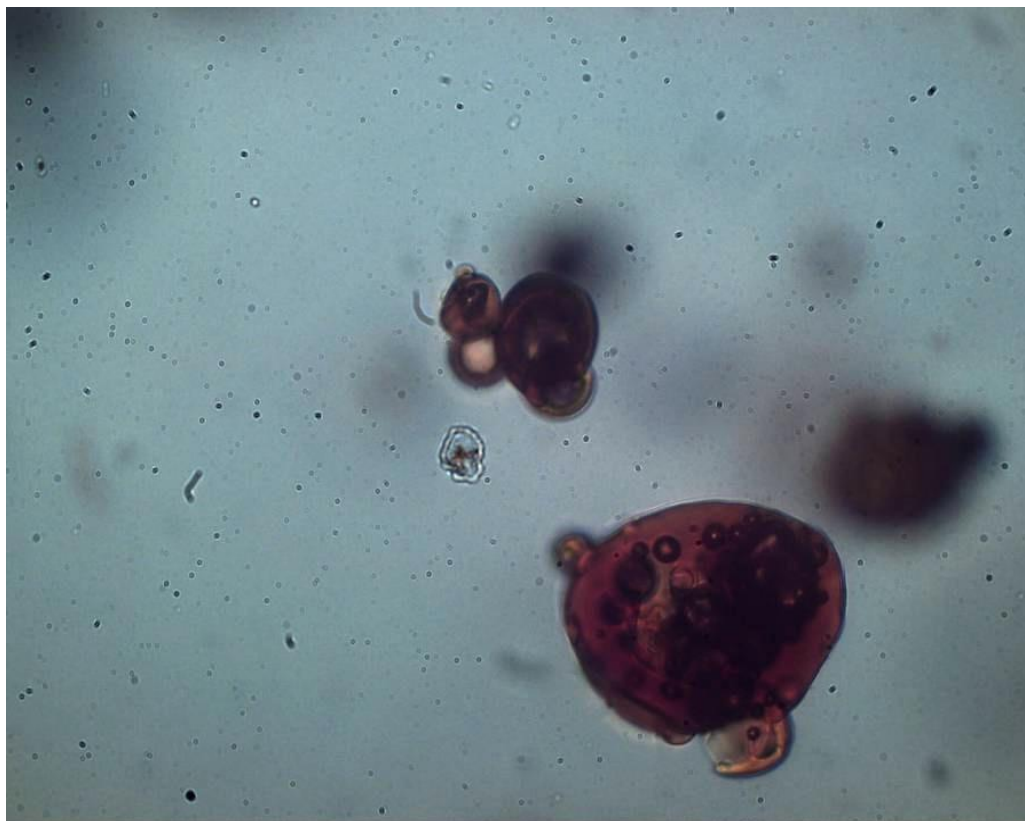
Jednym z najczęściej stosowanym w żywieniu zwierząt hodowlanych materiałów pochodzenia zwierzęcego jest mączka z krwi i produkty z krwi. Proces produkcji mączki z krwi obejmuje następujące etapy:

- suszenie krwi w temperaturze 100-170°C,
 - suszenie wstępne metodą rozpyłową lub bębnową (walcową),
 - suszenie końcowe (wyjaławianie i koagulacja)
- studzenie do temperatury 20°C
- mielenie.

Elementy krwi są mało charakterystyczne, nie możliwe do identyfikacji w badaniu próbek mieszanek paszowych zawierających swym składzie dodatki mineralne, aminokwasowe (Fot. 109, 110).



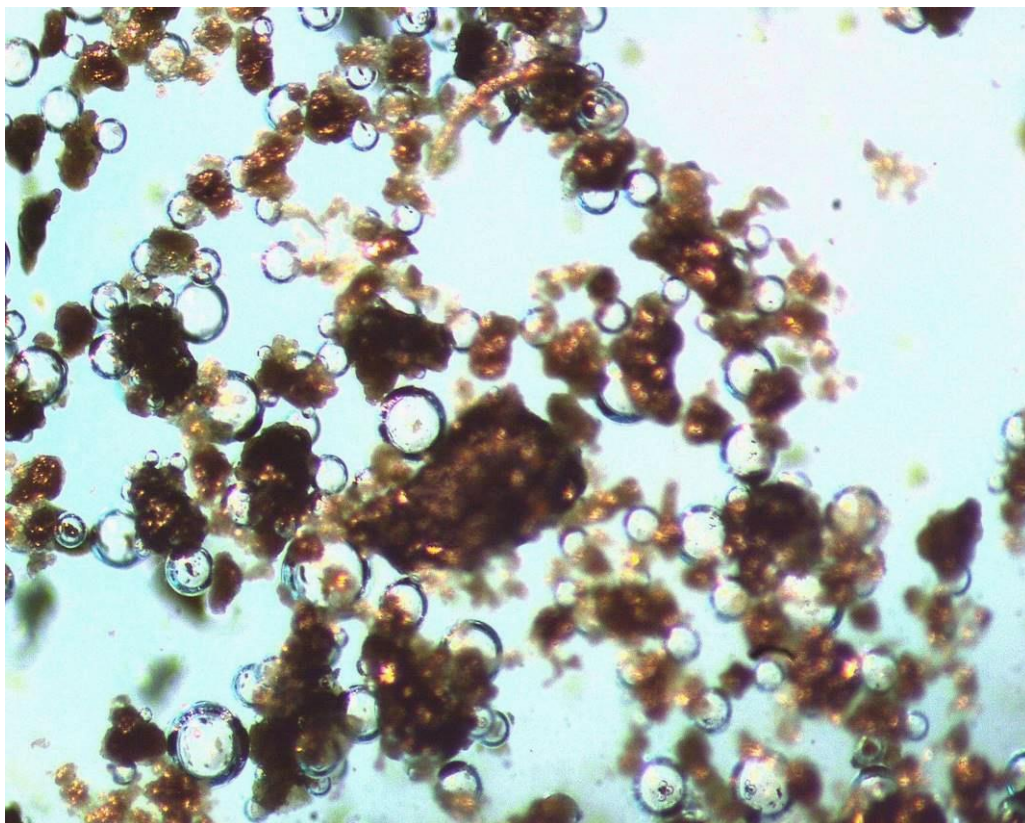
Fot. 109. Obraz mikroskopowy suszonych krwinek wieprzowych (200x).



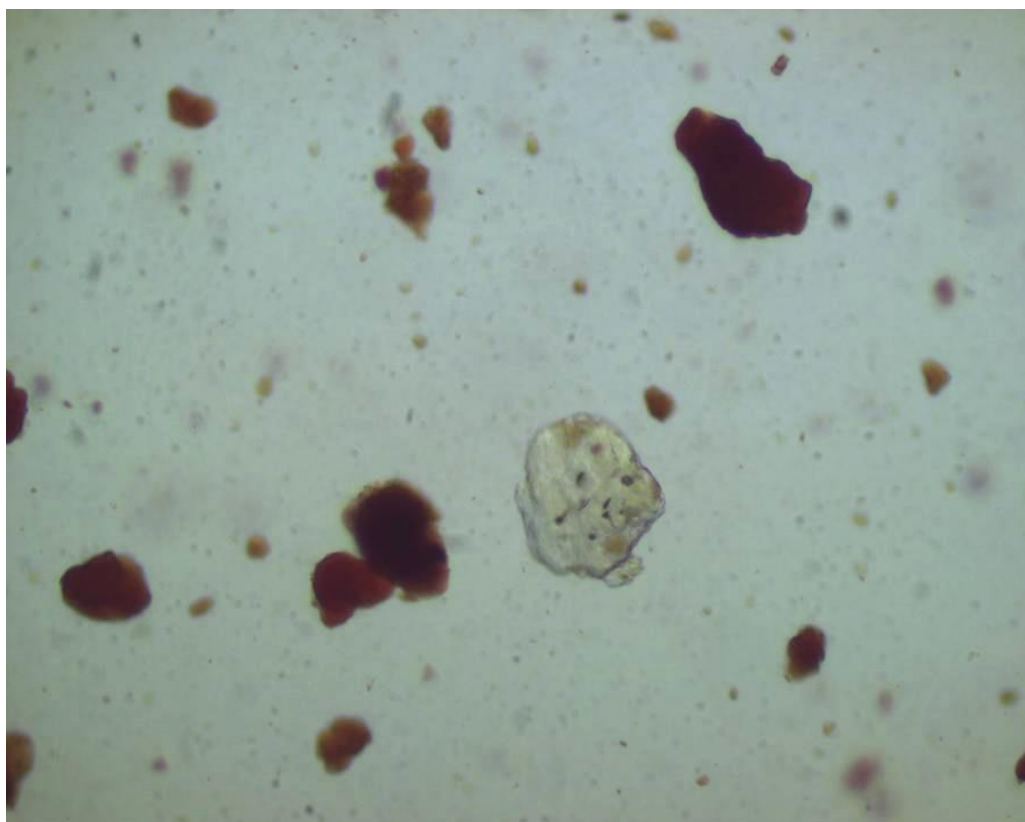
Fot. 110. Obraz mikroskopowy krwinki wieprzowej (400x).

W celu wykrycia dodatku produktów z krwi do mieszanki paszowej możliwe jest zastosowanie mieszaniny tetrametylbenzydyny z 3% nadtlenkiem wodoru (4:1). Peroksydaza zawarta w nadtlenku wodoru reaguje z hemem w wyniku czego powstaje sino – zielona zabarwienie mieszaniny, natomiast reakcja katalazy z krwią widoczna jest w formie bąbelków powietrza (Fot. 111). W procesie walidacji określono granicę wykrywalności tego rodzaju materiału na poziomie 2%.

W przypadku mączki z krwi suszonej metodą bębnową w badaniu mikroskopowym osadu widoczne są elementy kostne (Fot. 112).



Fot. 111. Widoczne pęcherzyki powietrza powstające w wyniku reakcji katalazy z krwią (100x).



Fot. 112. Fragment kości w osadzie próbki mączki z krwi (100x).

4.4. Wykrywanie elementów pochodzących z owadów

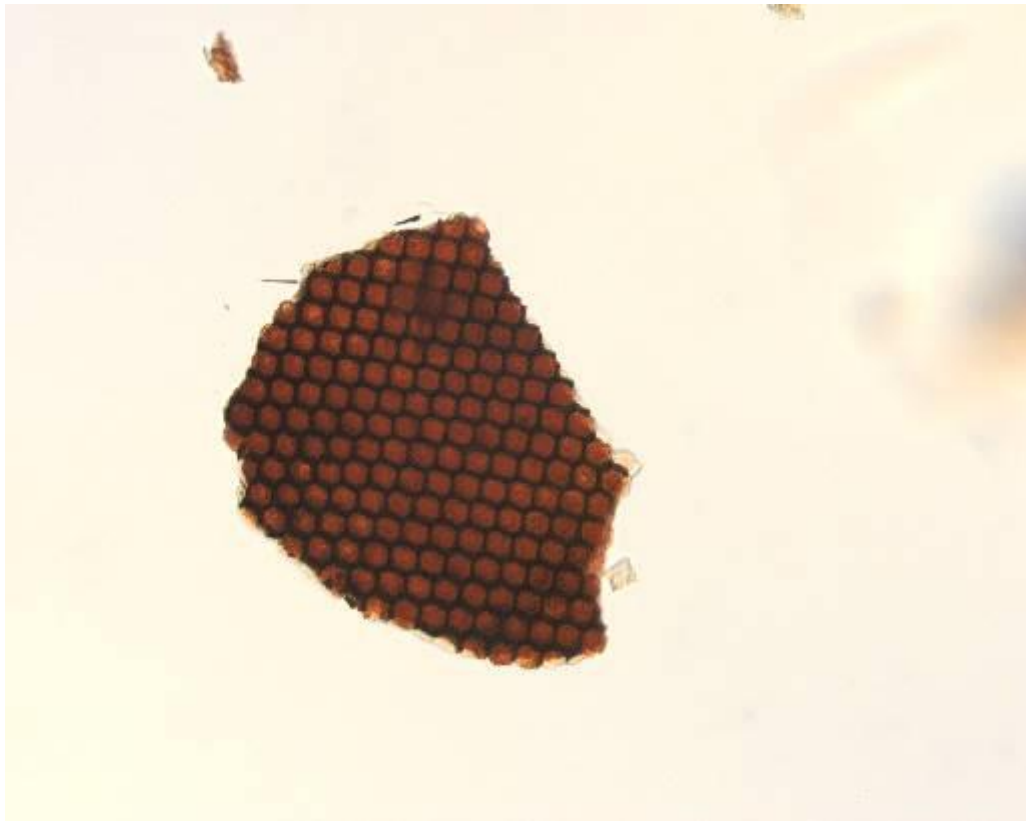
Obecność fragmentów charakterystycznych dla owadów stwierdzano w drugim flotacie otrzymanym w wyniku przeprowadzenia podwójnej sedymentacji z zastosowaniem mieszaniny eteru naftowego i tetrachloroetyleny.

4.4.1. Czarna mucha (*Hermetia illucens*)

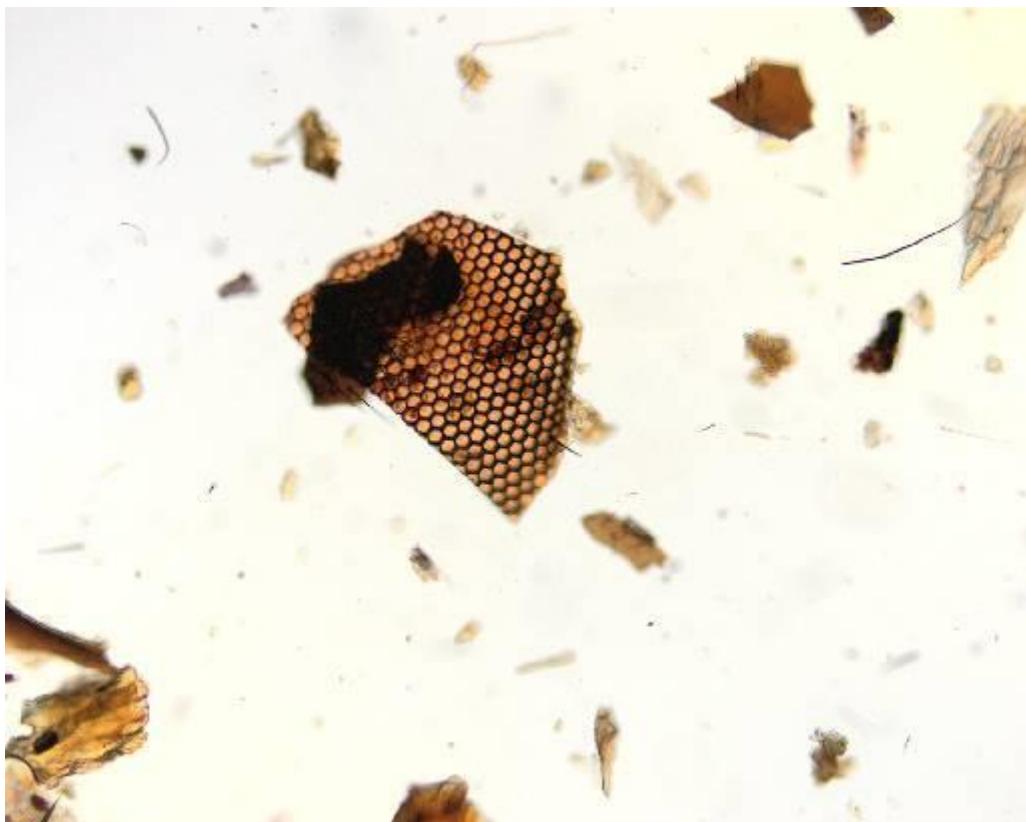
Charakterystyczne elementy egzoszkieletu czarnej muchy mają kolor od szaro-kremowego do ciemnobrązowego. Fragmenty egzoszkieletu widoczne są w postaci łusek o powierzchni przypominającej strukturę komórkową, cztero- lub pięciościenna struktura z jaśniejszym środkiem. Grube ścianki nadają komórkom wygląd plastra miodu (Fot. 113-115). Ponadto na fragmentach egzoszkieletu widoczne są szczecinki (Fot. 116-119). Przeważnie długie, wąskie, koloru żółto-brązowego.



Fot. 113. Fragment egzoszkieletu much czarnej o charakterystycznym wyglądzie przypominającym plaster miodu (100x).



Fot. 114. Fragment egzoszkieletu much czarnej o charakterystycznym wyglądzie przypominającym plaster miodu (200x).



Fot. 115. Fragment egzoszkieletu much czarnej o charakterystycznym wyglądzie przypominającym plaster miodu (100x).



Fot. 116. Fragment egzoszkieletu much czarnej z widocznymi szczecinkami (100x).



Fot. 117. Fragment egzoszkieletu much czarnej z widocznymi szczecinkami (100x).



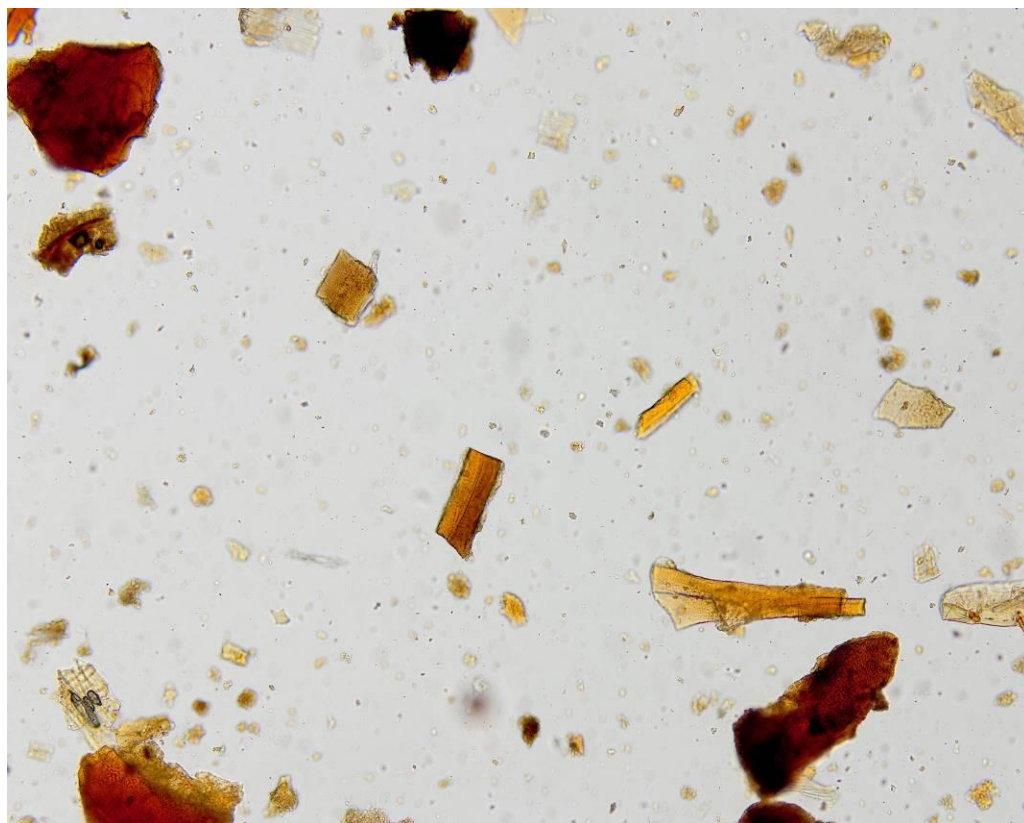
Fot. 118. Fragment egzoszkieletu much czarnej z widocznymi szczecinkami (200x).



Fot. 119. Fragment egzoszkieletu much czarnej z widocznymi szczecinkami (400x).

4.4.2. Mącznik młynarek (*Tenebrio molitor*)

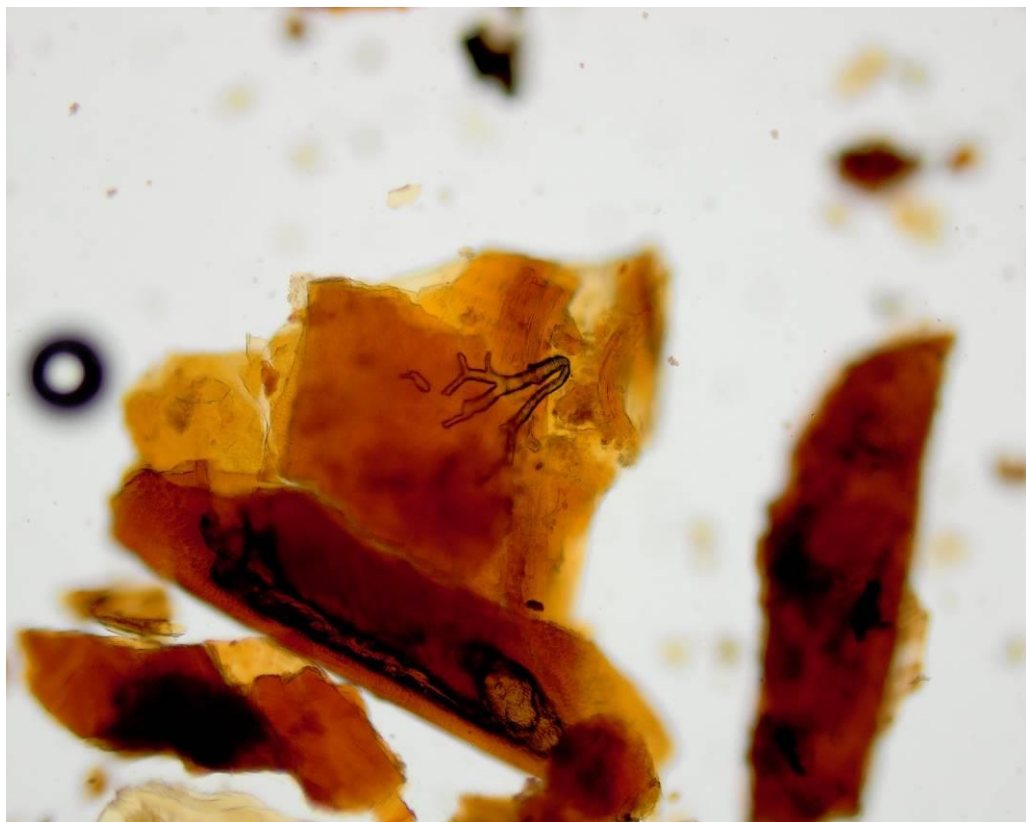
Fragmenty charakterystyczne dla mącznika młynarka mają kolor od szarego do bursztynowego (Fot. 120-122). Struktury posiadają jedynie pojedyncze kropki w kolorze ciemnobrązowym, z których niekiedy wystaje pojedyncza szczecinka (Fot. 121).



Fot. 120. Obraz mikroskopowy mączki z owadów mącznik młynarek (*Tenebrio molitor*) larwy (100x).



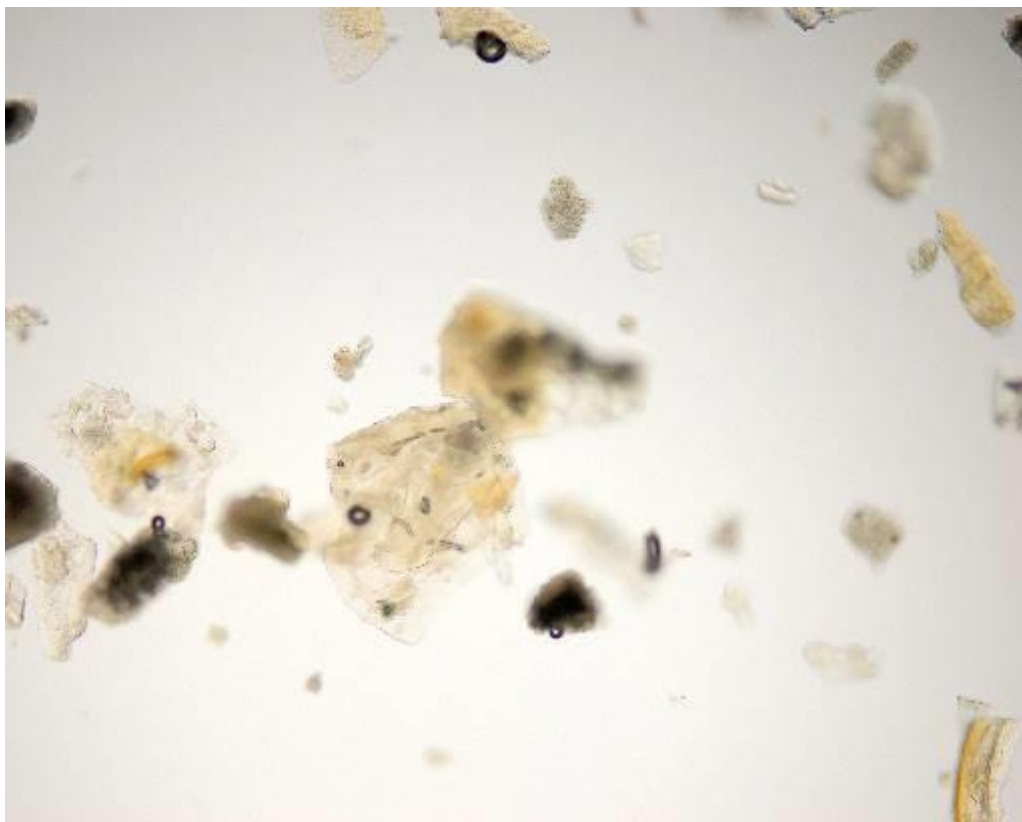
Fot. 121. Obraz mikroskopowy fragmentu egzoszkieletu larwy mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*) z widocznymi pojedynczymi kropkami (100x).



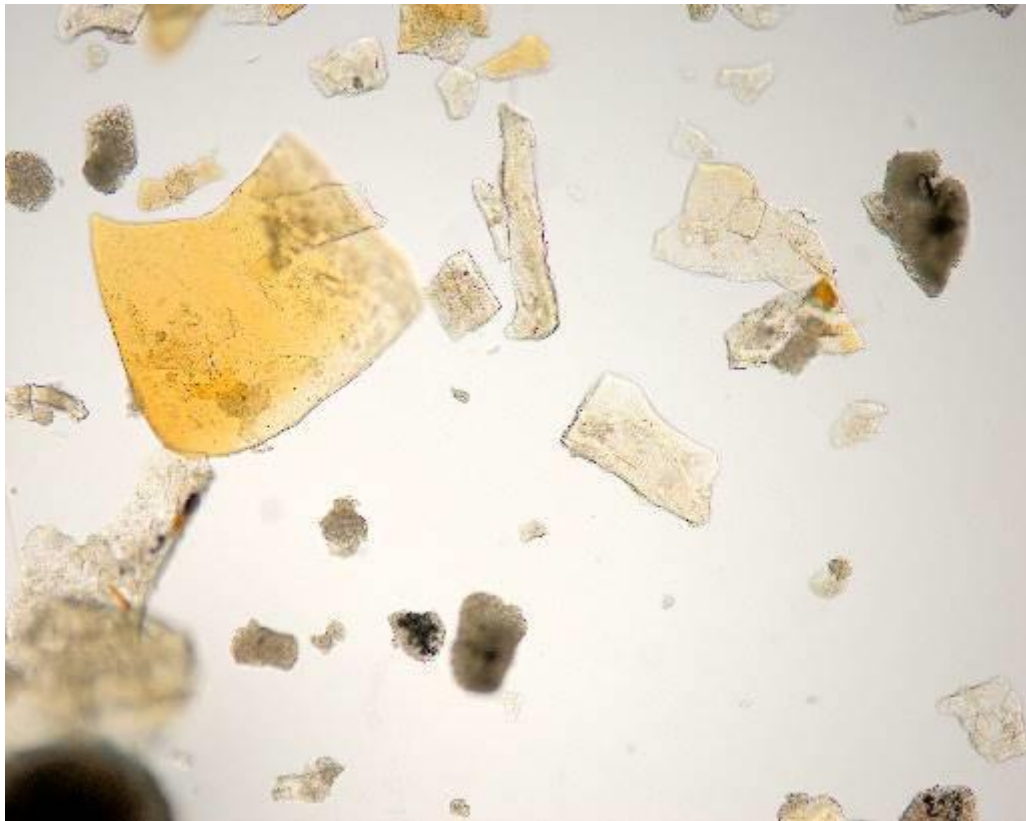
Fot. 122. Obraz mikroskopowy fragmentu egzoszkieletu larwy mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*) z widocznymi pojedynczymi kropkami (100x).

4.4.3. Pleśniakowiec lśniący (*Alphitobius diaperinus*)

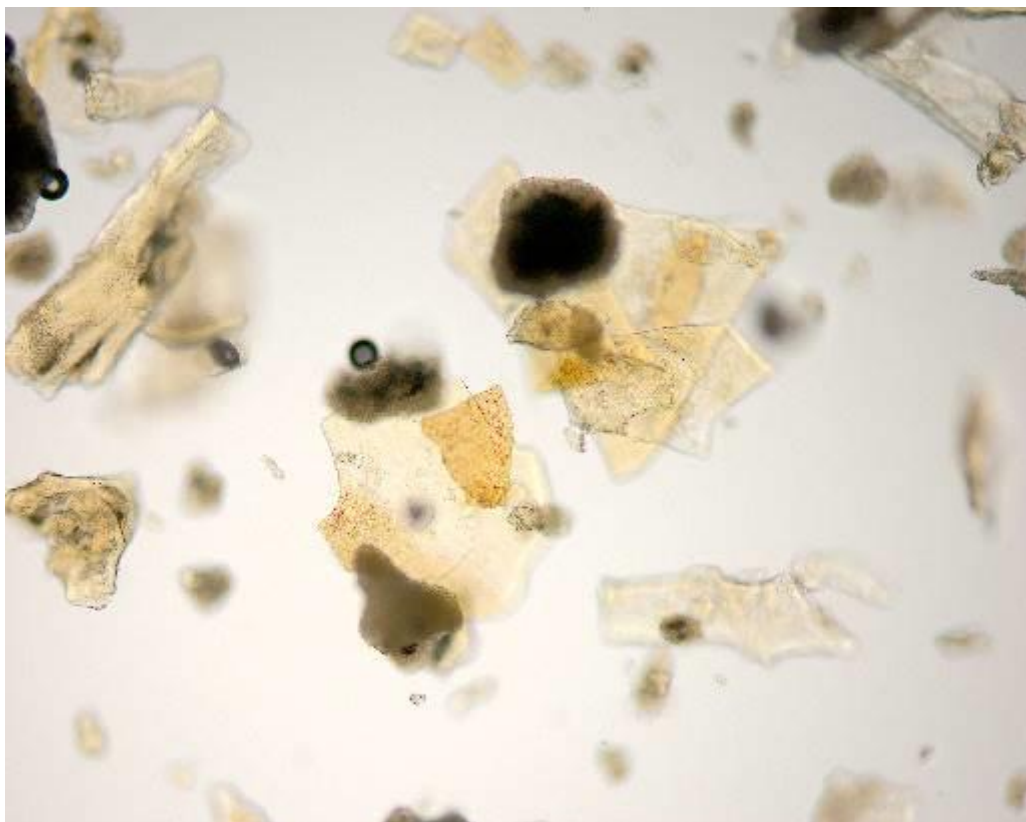
Charakterystyczne fragmenty egzoszkieletu można zaobserwować w postaci łusek, koloru od jasno- do ciemnożółtego (Fot. 123-130). Na powierzchni widoczne są niekiedy pojedyncze czarne kropki. Nie stwierdzono obecności szczecinek.



Fot. 123. Obraz mikroskopowy pleśniakowca lśniącego (100x).



Fot. 124. Obraz mikroskopowy pleśniakowca lśniącego (100x).



Fot. 125. Obraz mikroskopowy pleśniakowca lśniącego (100x).



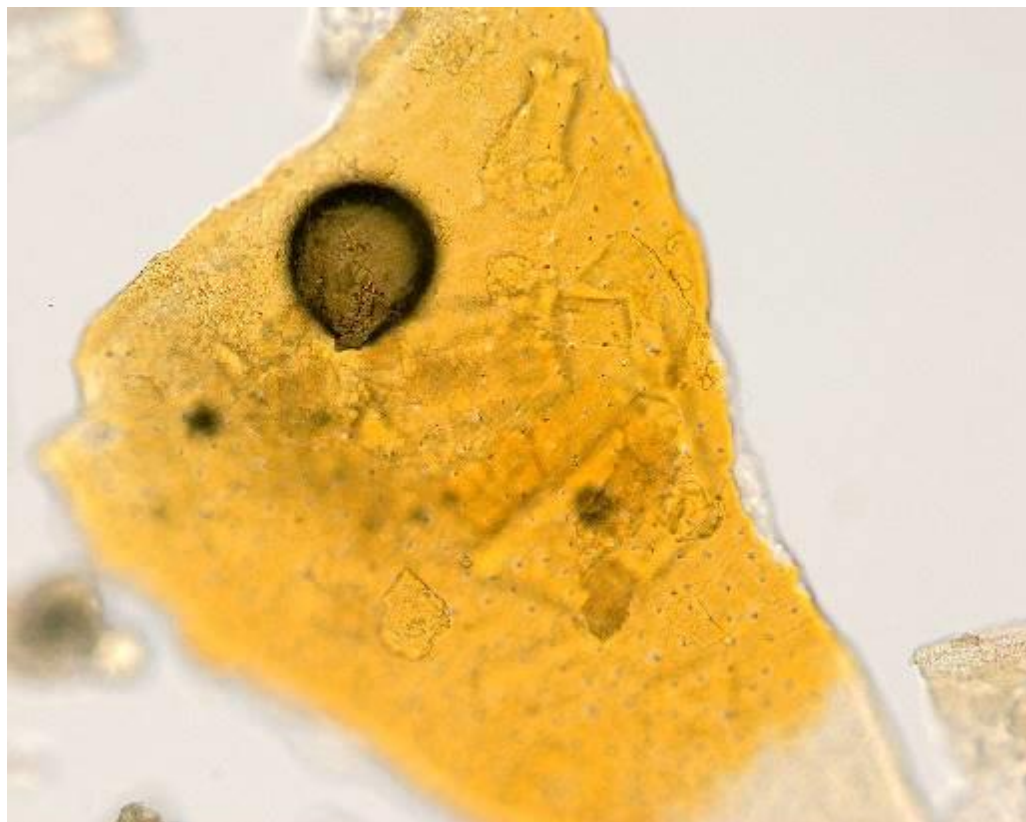
Fot. 126. Obraz mikroskopowy pleśniakowca lśniącego (100x).



Fot. 127. Obraz mikroskopowy pleśniakowca lśniącego (100x).



Fot. 128. Obraz mikroskopowy pleśniakowca lśniącego (200x).



Fot. 129. Obraz mikroskopowy pleśniakowca lśniącego (200x).



Fot. 130. Obraz mikroskopowy pleśniakowca lśniącego (100x).

4.4.4. Świerszcze: świerszcz domowy (*Acheta domestica*), świerszcz bananowy (*Gryllus sigillatus*), świerszcz kubański (*Gryllus assimilis*)

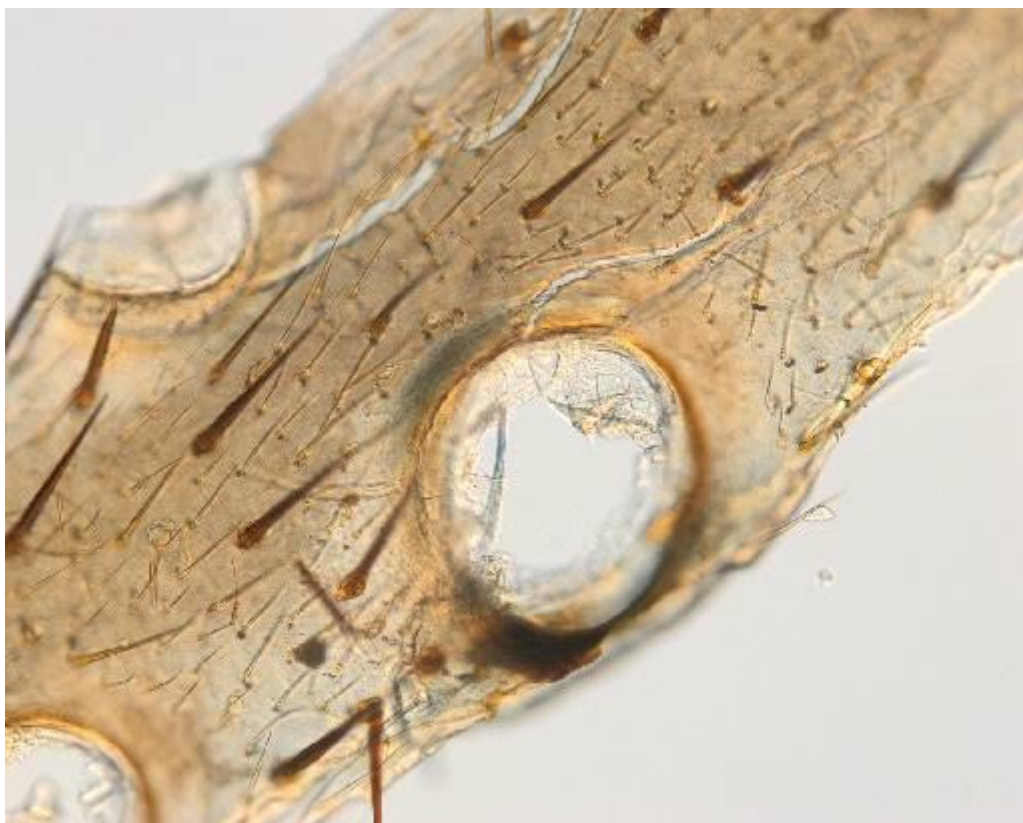
Elementy typowe dla egzoszkieletu świerszczy występują w formie łusek o kolorze od jasno- do ciemnobrązowego (Fot. 131-136, 144, 145, 148). Na powierzchni widoczne są liczne kropki, z których bardzo często wystają różnej grubości i długości szczecinki (Fot. 132-134, 136, 139-141, 143). Szczecinki są bardzo rzadko spotykane w przypadku świerszcza kubańskiego, natomiast bardziej widoczne są ciemnobrązowe kropki na powierzchni fragmentów egzoszkieletu (Fot. 144-147). Niekiedy można spotkać segmentowane struktury z licznymi szczecinkami (Fot. 137, 138, 142), lub całkowicie ich pozbawione (świerszcz kubański).



Fot. 131. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza domowego (100x).



Fot. 132. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza domowego (200x).



Fot. 133. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza domowego (400x).



Fot. 134. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza domowego (200x).



Fot. 135. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza domowego (100x).



Fot. 136. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza bananowego (100x).



Fot. 137. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza bananowego (100x).



Fot. 138. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza bananowego (100x).



Fot. 139. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza bananowego (100x).



Fot. 140. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza bananowego (200x).



Fot. 141. Obraz mikroskopowy fragmentu odnóży świerszcza bananowego (100x).



Fot. 142. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza bananowego (100x).



Fot. 143. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza bananowego (100x).



Fot. 144. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza kubańskiego, brak widocznych szczecinek (100x).



Fot. 145. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza kubańskiego z widocznymi kilkoma szczecinkami (100x).



Fot. 146. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza kubańskiego, brak widocznych szczecinek (100x).



Fot. 147. Obraz mikroskopowy egzoszkieletu świerszcza kubańskiego z widoczną pojedynczą szczecinką (100x).

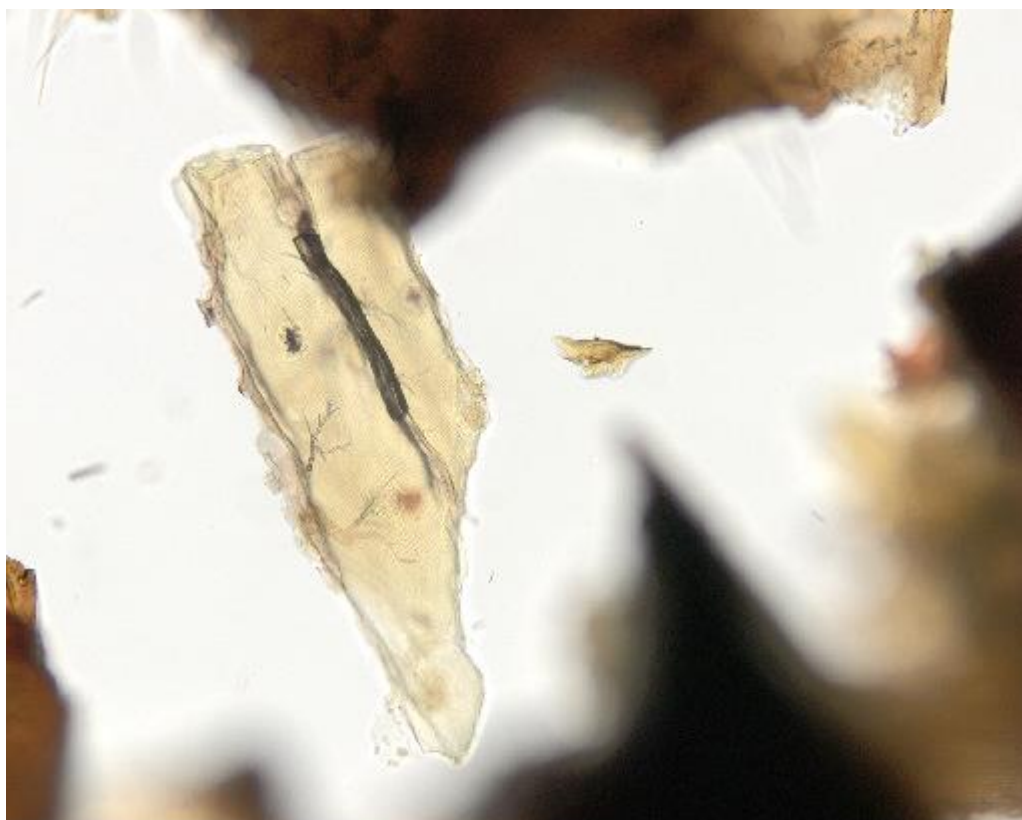


Fot. 148. Obraz mikroskopowy fragmentu odnóża świerszcza kubańskiego (200x).

4.4.5 Inne typowe elementy z owadów

W obrazie mikroskopowym materiału pochodzącego z owadów bardzo charakterystyczny jest widok fragmentów układu oddechowego. W przypadku owadów jest on zbudowany z tchawek, czyli systemu chitynowych rurek oddechowych odgałęziających się po całym ciele. Najcieńsze tchawki, tzw. tracheole docierają do każdej komórki ciała. Tchawki można zaobserwować we fragmentach egzoszkieletu, włóknach mięśniowych w postaci poprzecznie prążkowanych rurek (Fot. 152, 153).

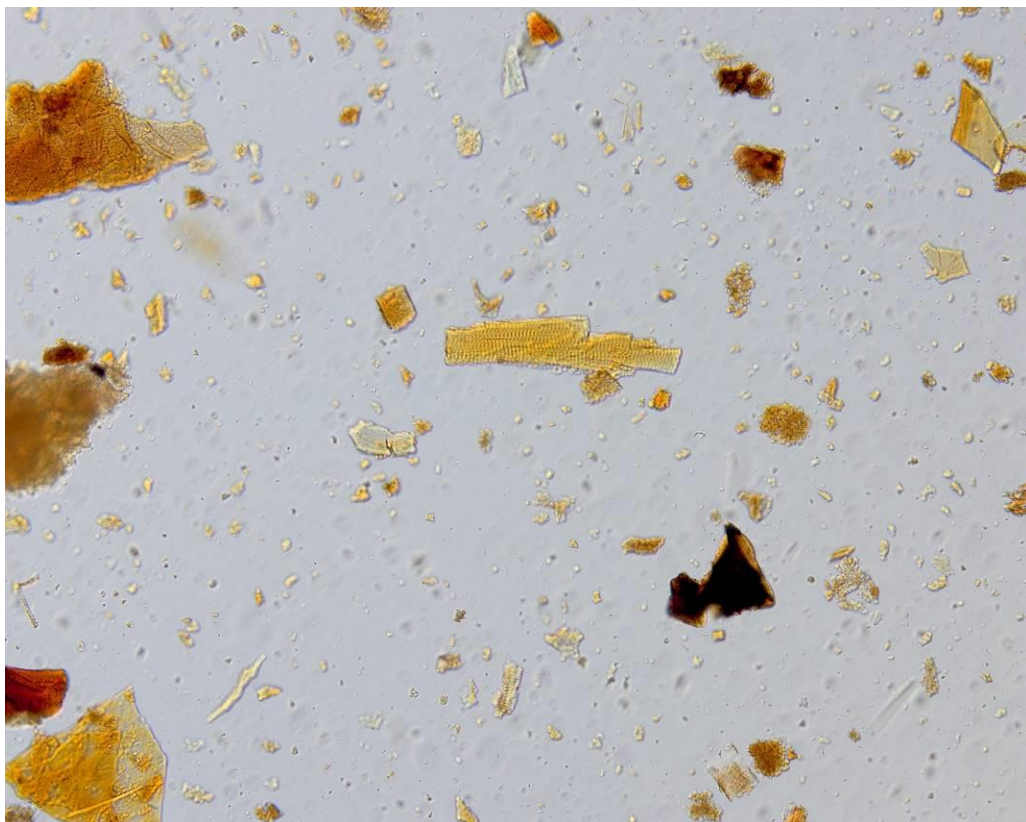
Ponadto specyficzny jest wygląd włókien mięśniowych owadów. Zazwyczaj są często spotykane w preparatach mikroskopowych w postaci prostokątnych, niemal przezroczystych struktur (Fot. 151, 155). Najczęściej widoczne są w skupiskach. Typowy jest zygzakowaty układ sarkomerów i obecność tracheoli (Fot. 149, 150, 154, 156).



Fot. 149. Obraz mikroskopowy fragmentu tracheoli widocznej w włóknie mięśniowym owada (100x).



Fot. 150. Obraz mikroskopowy włókna mięśniowego z widoczną tracheolą pleśniakowca lśniącego (100x).



Fot. 151. Obraz mikroskopowy włókna mięśniowego larwy mącznika młynarka (200x).



Fot. 152. Obraz mikroskopowy tracheoli larwy mącznika młynarka (200x).



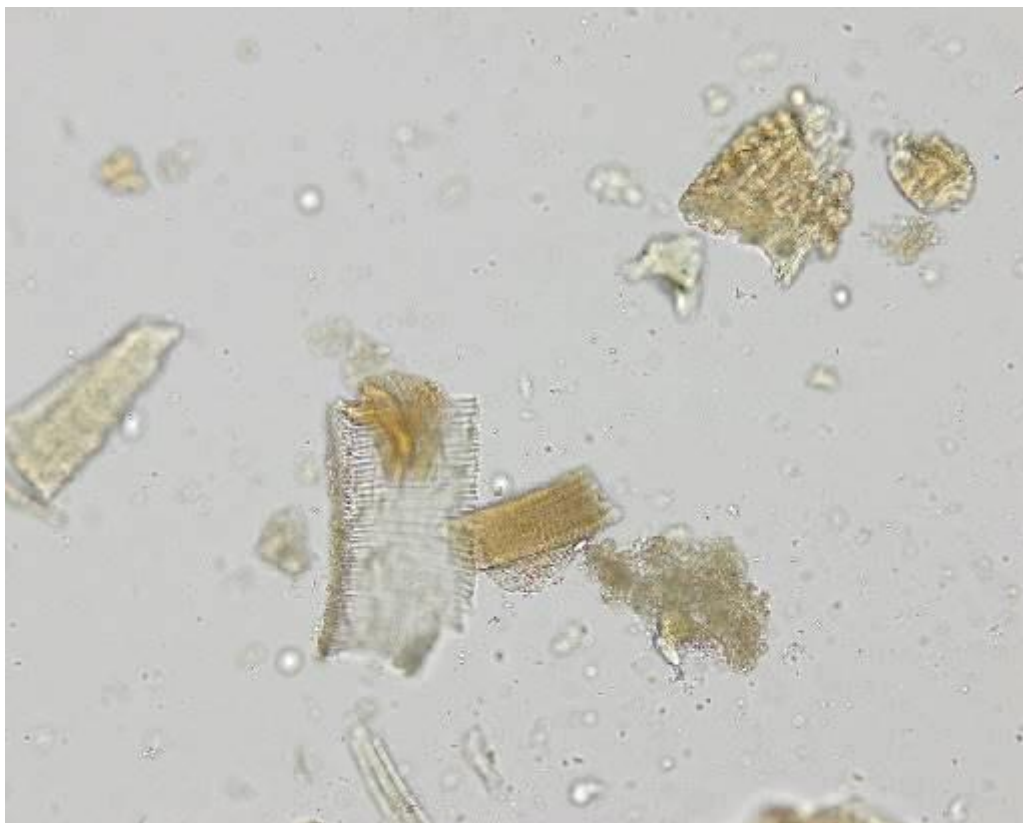
Fot. 153. Obraz mikroskopowy tracheoli larwy mącznika młynarka (400x).



Fot. 154. Obraz mikroskopowy zygzakowatego prążkowania widocznego we włóknie mięśniowym muchy czarnej (100x).

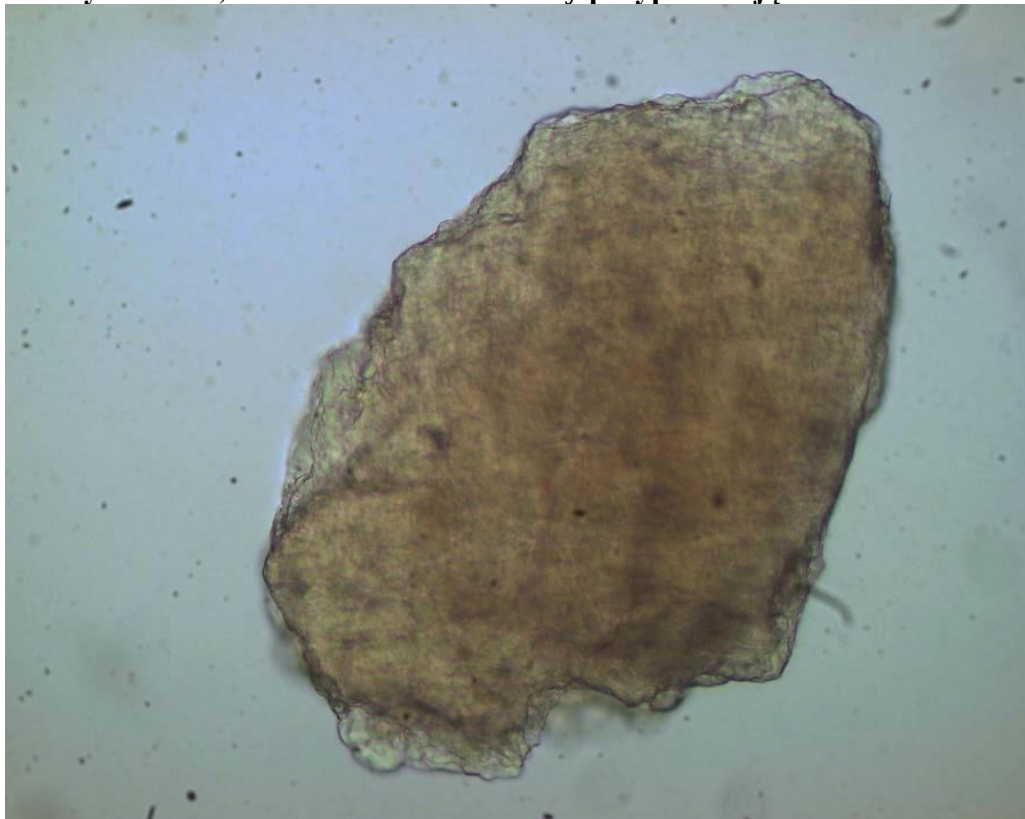


Fot. 155. Obraz mikroskopowy zygzakowatego prążkowania widocznego we włóknie mięśniowym muchy czarnej (100x).



Fot. 156. Obraz mikroskopowy fragmentu tracheoli oraz włókna mięśniowego muchy czarnej (100x).

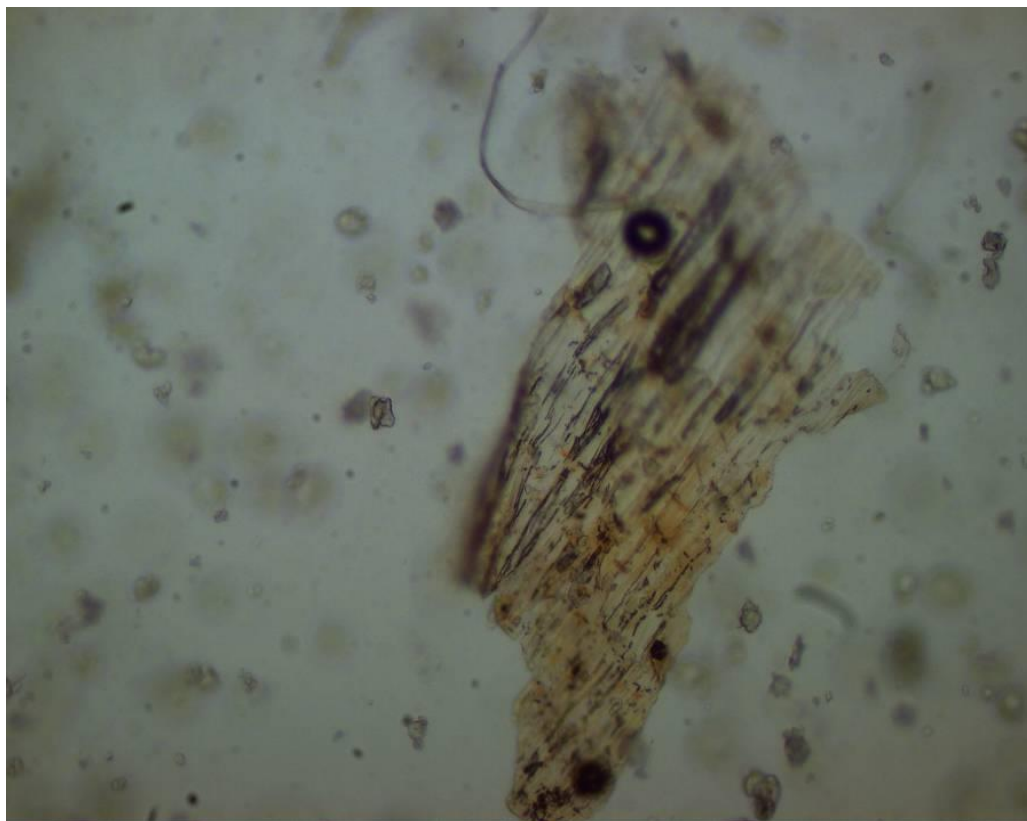
4.5. Elementy roślinne, mineralne oraz struktury przypominające składniki zwierzęce



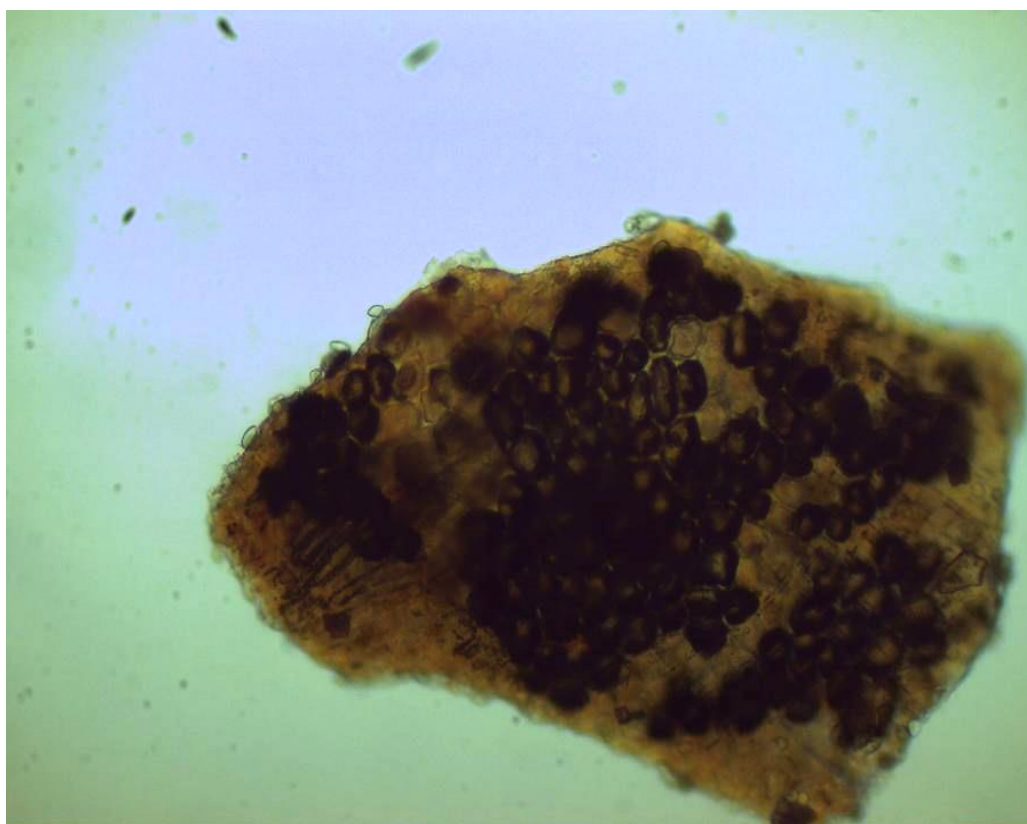
Fot. 157. Obraz mikroskopowy minerału pod mikroskopem biologicznym (200x).



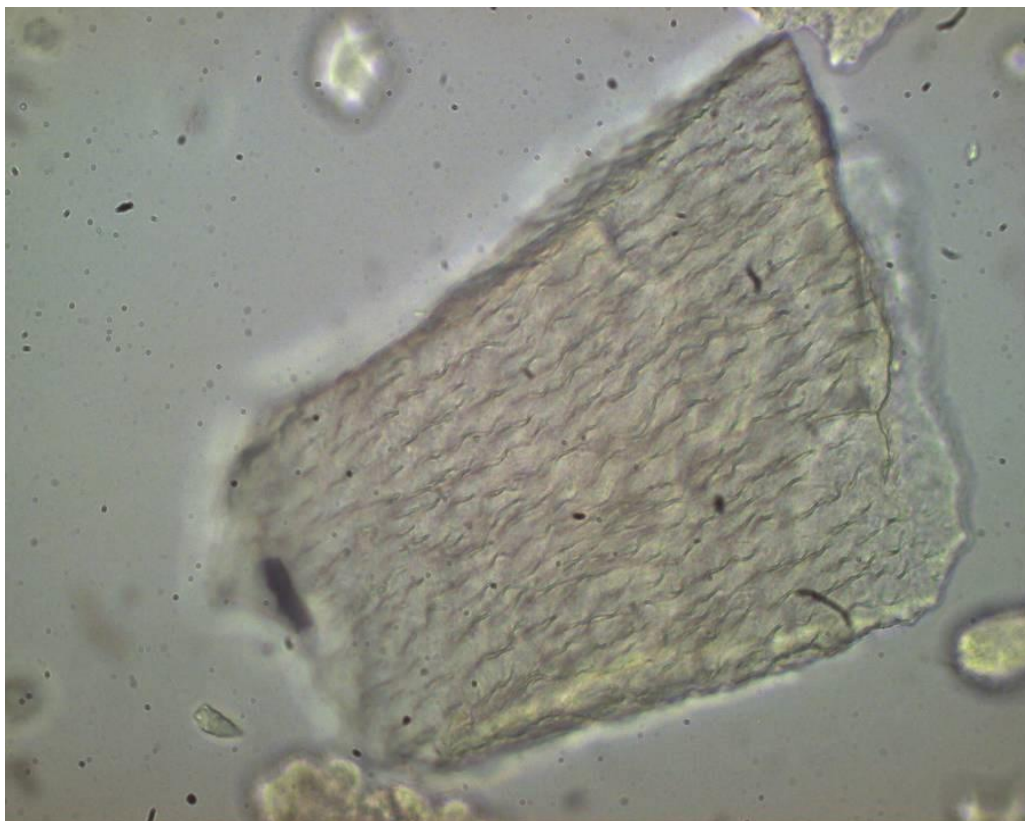
Fot. 158. Obraz mikroskopowy elementu roślinnego przypominającego łuskę rybią (100x).



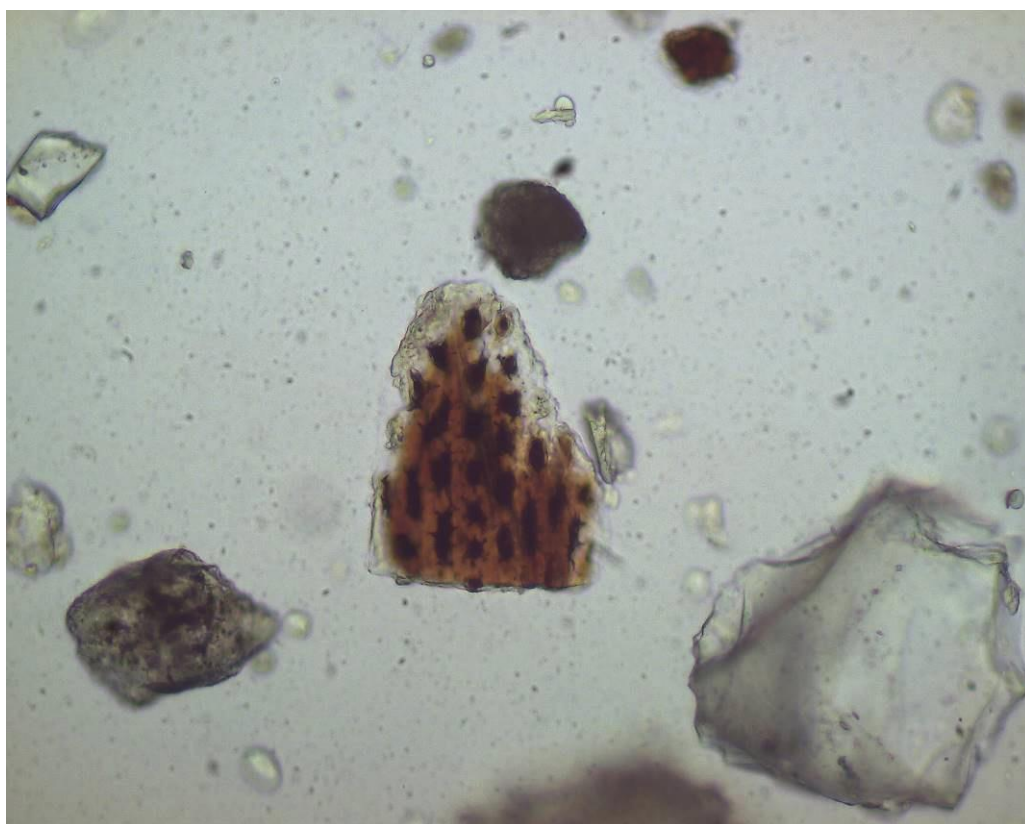
Fot. 159. Obraz mikroskopowy fragmentu owsa przypominającego składniki kostne (100x).



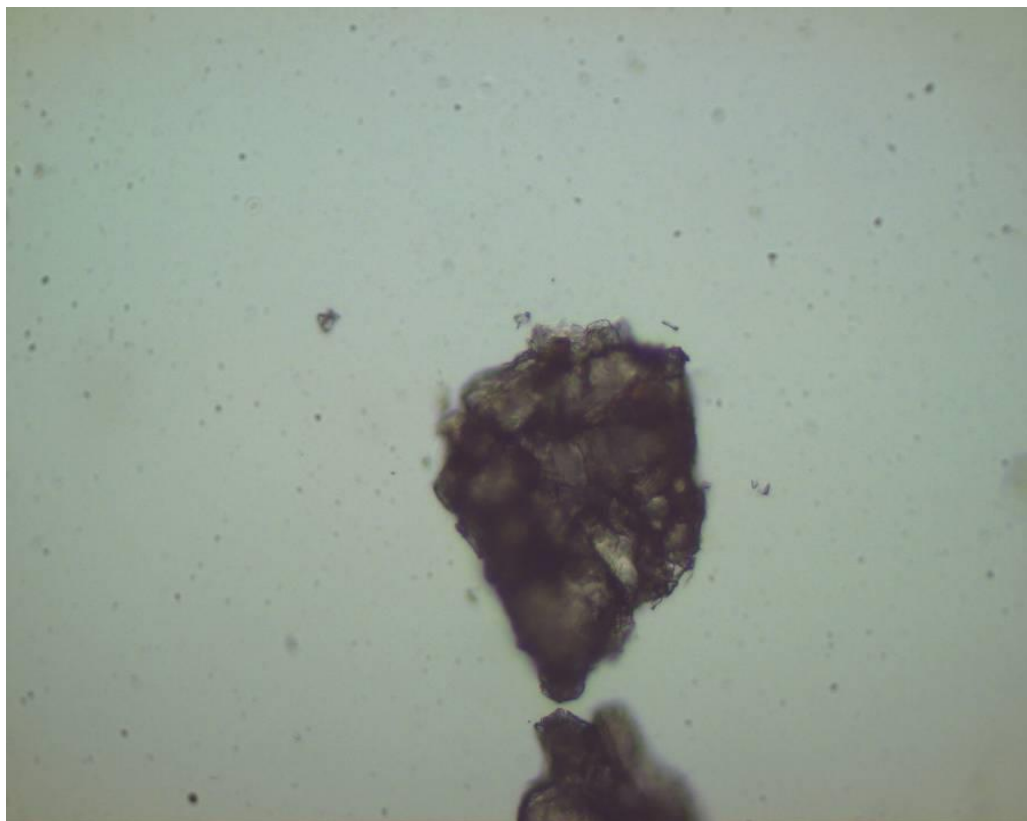
Fot. 160. Obraz mikroskopowy fragmentu roślinnego przypominającego składniki kostne (100x).



Fot. 161. Obraz mikroskopowy fragmentu roślinnego przypominającego składniki kostne (100x).



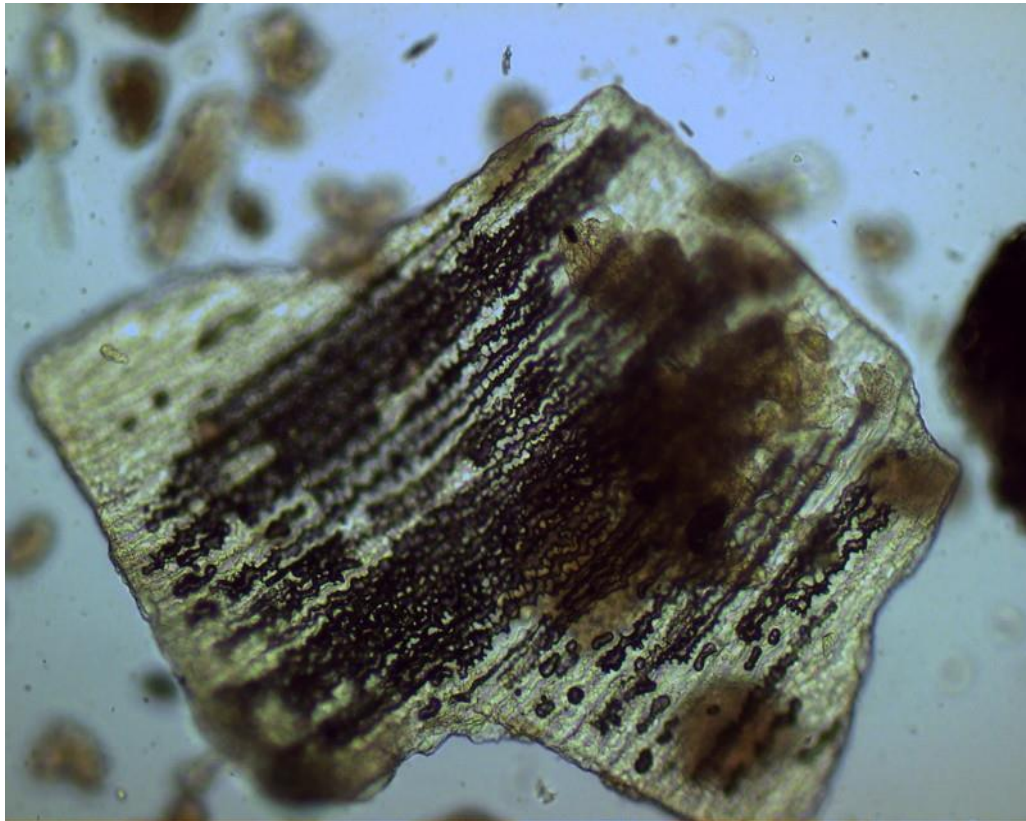
Fot. 162. Obraz mikroskopowy fragmentu roślinnego przypominającego składniki kostne (100x).



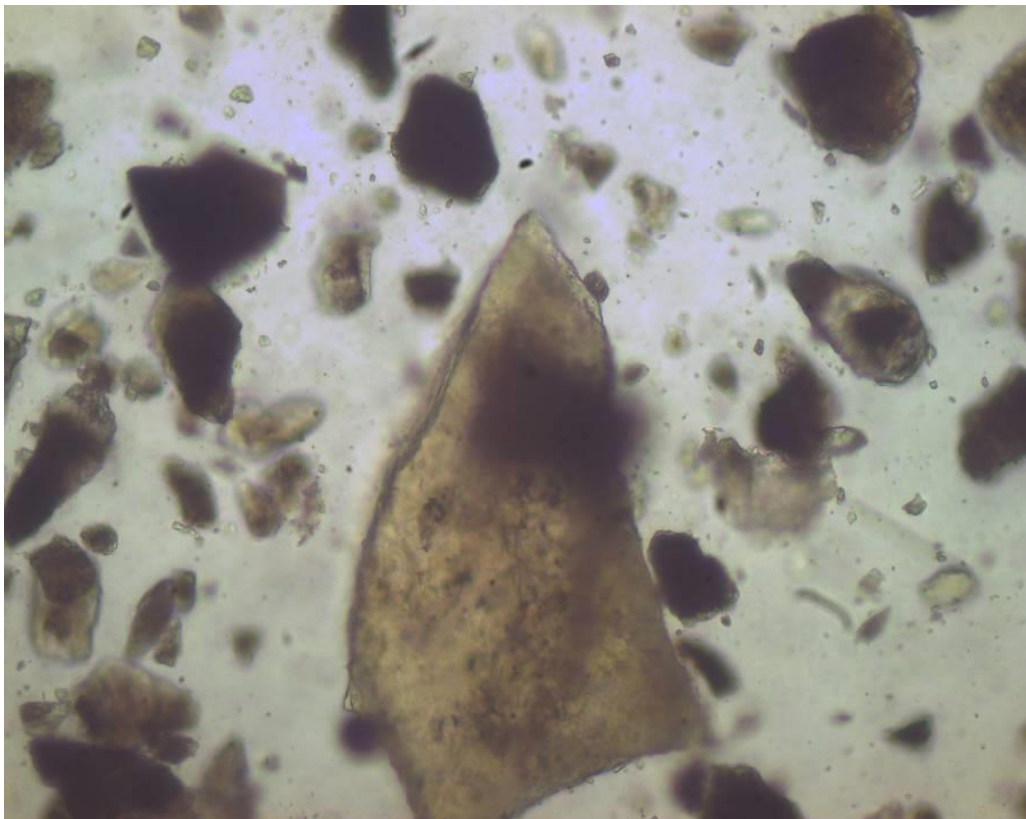
Fot. 163. Obraz mikroskopowy minerału pod mikroskopem biologicznym (100x).



Fot. 164. Obraz mikroskopowy minerału pod mikroskopem biologicznym (100x).



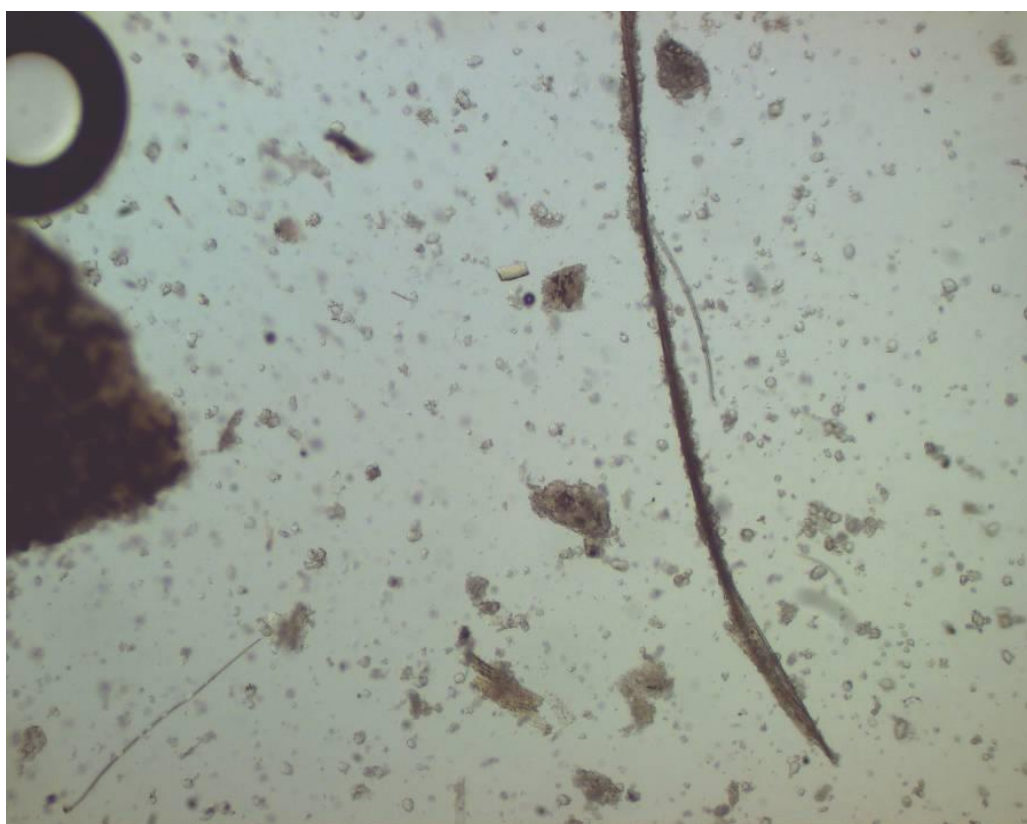
Fot. 165. Obraz mikroskopowy fragmentu roślinnego przypominającego składniki kostne (100x).



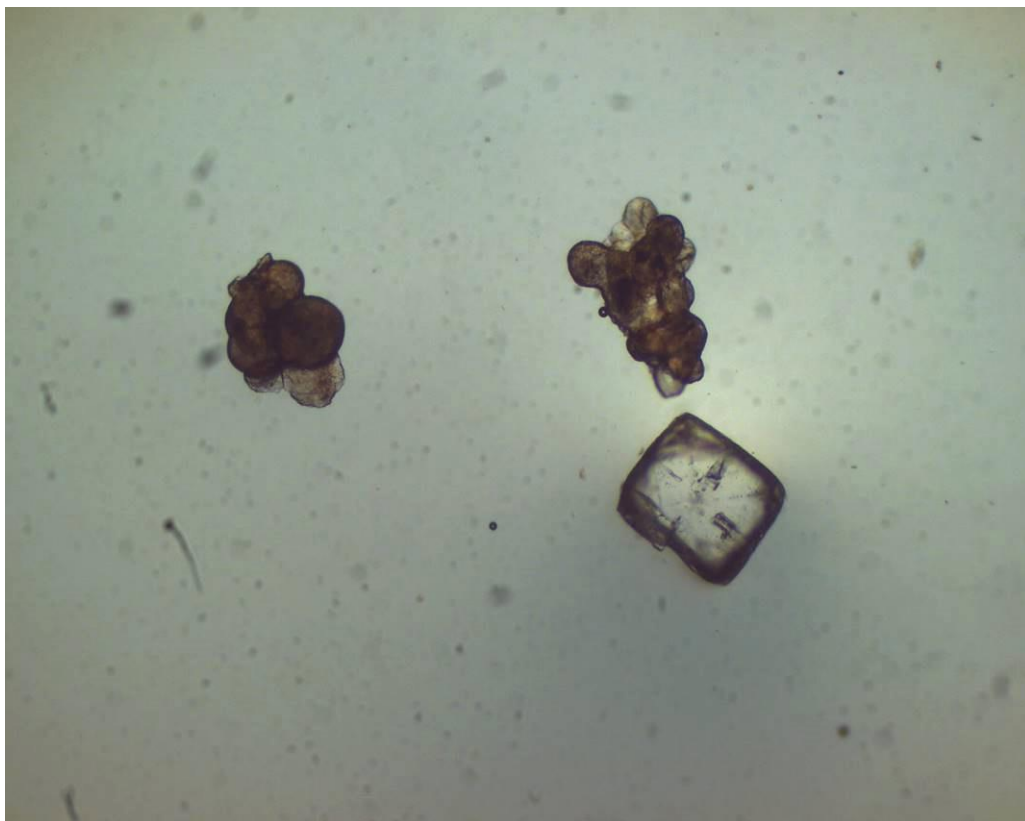
Fot. 166. Obraz mikroskopowy fragmentu roślinnego przypominającego składniki kostne (100x).



Fot. 167. Obraz mikroskopowy minerału pod mikroskopem biologicznym (100x).



Fot. 168. Obraz mikroskopowy fragmentu roślinnego przypominającego składniki kostne (100x).



Fot. 169. Obraz mikroskopowy elementów mineralnych (100x).

Piśmiennictwo

1. Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności, *Dz. U. L 31, 2002, 1-24, z późn. zm.*
2. Rozporządzenie (WE) nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych, *Dz. U. L 139, 2004, 1-54, z późn. zm.*
3. Rozporządzenie (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 12 stycznia 2005 r. ustanawiające wymagania dotyczące higieny pasz, *Dz. U. L 35, 2005, 1-22, z późn. zm.*
4. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 z dnia 25 listopada 2015 r. w sprawie nowej żywności, zmieniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 258/97 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie Komisji (WE) nr 1852/2001, *Dz. U. L 327, 2015, 1-22, z późn. zm.*
5. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego, *Dz. U. L 139, 2004, 55-205, z późn. zm.*
6. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego), *Dz. U. L 300, 2009, 1-33, z późn. zm.*
7. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 142/2011 z dnia 25 lutego 2011 r. w sprawie wykonania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 określającego przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, oraz w sprawie wykonania dyrektywy Rady 97/78/WE w odniesieniu do niektórych próbek i przedmiotów zwolnionych z kontroli weterynaryjnych na granicach w myśl tej dyrektywy, *Dz. U. L 54, 2011, 1-254, z późn. zm.*
8. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r. ustanawiające zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych przenośnych gąbczastych encefalopatii, *Dz. U. L 147, 2001, 1-40, z późn. zm.*

9. Rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt, *Dz.U. L 268, 2003, 29-43, z późn. zm.*
10. Dyrektywa 2002/32/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 7 maja 2002 r. w sprawie niepożądanych substancji w paszach zwierzęcych, *Dz. U. L 140, 2002, 10-22, z późn. zm.,*
11. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, *Dz. U. L 338, 2005, p. 1-26, z późn. zm.*
12. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/429 z dnia 9 marca 2016 r. w sprawie przenośnych chorób zwierząt oraz zmieniające i uchylające niektóre akty w dziedzinie zdrowia zwierząt („Prawo o zdrowiu zwierząt”), *Dz. U. L 84, 2016, 1-208, z późn. zm.*
13. Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/1017 z dnia 15 czerwca 2017 r. zmieniające rozporządzenie Komisji (UE) nr 68/2013 w sprawie katalogu materiałów paszowych, *Dz. U. L 159, 2017, 48-119, z późn. zm.*
14. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1143/2014 z dnia 22 października 2014 r. w sprawie działań zapobiegawczych i zaradczych w odniesieniu do wprowadzania i rozprzestrzeniania inwazyjnych gatunków obcych, *Dz. U. L 317, 2014, 35-55, z późn. zm.*
15. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności, zmiany rozporządzeń Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1924/2006 i (WE) nr 1925/2006 oraz uchylenia dyrektywy Komisji 87/250/EWG, dyrektywy Rady 90/496/EWG, dyrektywy Komisji 1999/10/WE, dyrektywy 2000/13/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, dyrektyw Komisji 2002/67/WE i 2008/5/WE oraz rozporządzenia Komisji (WE) nr 608/2004, *Dz. U. L 304, 2011, 18-63, z późn. zm.*
16. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2020/1560 z dnia 26 października 2020 r. zmieniające załącznik VI do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 ustanawiający metody analizy dotyczące oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz, *Dz. U. L 357, 2020, 17-23.*
17. Sánchez-Muros M.-J., Barroso F. G., Manzano-Agugliaro F. 2014 Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production* 65 (2014) 16-27.

18. Veys P., Baeten V. 2018. Protocol for the isolation of processed animal proteins from insects in feed and their identification by microscopy. *Food Control*, 92, 496-504, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.028>
19. Ottoboni M., Tretola M., Cheli F., Marchis D., Veys P. Baeten V., Pinotti L. 2017. Light microscopy with differentia staining techniques for the characterisation and discrimination of insects versus marine arthropods processed animal proteins. *Fodd Additives & Contaminants: Part A*, 8, 1377-1383, <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1278464>
20. Zielińska E., Baraniak B., Karaś M., Rybczyńska K., Jakubczyk A. 2015. Selected species of edible insects as source of nutrient composition. *Food Research International*, 77, 460-466, https://doi.org/10.1007/978-3-319-54528-8_67-1
21. Makkar H.P.S., Tran G., Heuzé V., Ankers P. State-of-the-art. 2014. On use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 197, 1-33, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>
22. Kwiatek K., Przeniosło M., Weiner A.: 2013. Przewodnik do metody mikroskopowej wykrywania przetworzonego białka zwierzęcego w środkach żywienia zwierząt. Pulawy: Wydawnictwo PIWet-PIB, Pulawy.
23. Barroso F.G., de Haro C., Sanchez-Muros M.J., Venegas E., Martinez-Sanchez A., Perez-Bañón C., 2014. The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, 422-423, 193-201, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.024>
24. Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady. Druga mapa drogowa dla TSE. Dokument strategiczny w sprawie pasażowalnych encefalopatii gąbczastych na lata 2010-215 (COM(2010) 384 final z 16 lipca 2010 r.).
25. Woodgate S.L., Hoven S. van der, Vaessen J., Margry R.: Control tools to detect processed animal proteins in feed and in animal by-products: specificity and challenges. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2009, 13, 9–13.
26. Pegels N., González I., Fernández S., García T., Martin R. Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using a TaqMan real-time PCR assay. *Food Addit. Contam. Part A* 2012, 29, 1402-1412.
27. Prado M., Casqueiro J., Iglesias Y., Cepeda A., Barros- Velázquez J. Application of polymerase chain reaction (PCR) method as a complementary tool to microscopic analysis for the detection of bones and other animal tissues in home-made animal meals. *J. Sci. Food Agric.* 2004, 84, 505-512.