



INSPEKCJA WETERYNARYJNA

I N S T R U K C J A

GLÓWNEGO LEKARZA WETERYNARII

Nr GIWlab 5110-65/09

z dnia 01 grudnia 2009 r.

**określająca postępowanie przy wykonywaniu
urzędowego badania mięsa na włośnice metodą
wytrawiania próbki zbiorczej
z zastosowaniem metody magnetycznego
mieszadła na podstawie rozporządzenia Komisji
(WE) 2075/2005**

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP

II. DEFINICJE

III. PRZEDMIOT INSTRUKCJI

IV. CEL INSTRUKCJI

V PRZEPISY PRAWNE I INNE DOKUMENTY

VI. POBIERANIE PRÓBEK Z TUSZ DO BADANIA NA OBECNOŚĆ WŁOŚNI ETAP PRZEDLABORATORYJNY

1. Świnie
2. Dzikie i świniodziki
3. Konie
4. Inne zwierzęta

VII. BADANIE MIĘSA NA WŁOŚNIE METODĄ WYTRAWIANIA PRÓBKĄ ZBIORCZĄ Z ZASTOSOWANIEM METODY MAGNETYCZNEGO MIESZADŁA – ETAP LABORATORYJNY

1. Wymagania dotyczące personelu laboratorium
2. Wymagania dotyczące warunków lokalowych i środowiskowych
3. Wymagania dotyczące wyposażenia oraz odczynników
4. Szczegółowe wskazówki dotyczące badania
5. Badanie mięsa na obecność włośni metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła
 - 5.1 Przygotowanie w laboratorium próbek do wytrawiania
 - 5.2 Próbki zbiorcze
 - 5.3 Badanie próbki zbiorczej o masie 100 g -115 g
 - 5.4 Badanie próbki zbiorczej o masie poniżej 100 g
 - 5.5 Postępowanie w przypadku uzyskania wyniku dodatniego lub wątpliwego
6. Wyniki badania
 - 6.1 Obliczanie wyników badania
 - 6.2 Sposób wyrażania ostatecznego wyniku badania
 - 6.3 Uprozczone sprawozdanie z badania
7. Zapisy dokumentujące realizację urzędowego badania mięsa na włośnię metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła

VIII. SPIS ZAŁĄCZNIKÓW

IX. POSTANOWIENIA KOŃCOWE.

I. WSTĘP

Poniższą instrukcję opracowano w Głównym Inspektoracie Weterynarii wraz z Krajowym Laboratorium Referencyjnym Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, w związku z potrzebą wskazania przebiegu postępowania diagnostycznego dla urzędowego badania mięsa w kierunku włośni, na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 2075/2005 z dnia 5 grudnia 2005 r. ustanawiającego szczególne przepisy dotyczące urzędowych kontroli w odniesieniu do włośni (*Trichinella*) w mięsie (Dz. Urz. UE nr L 338 z dnia 22.12.2005 str. 60) zwanego dalej rozporządzeniem WE. Instrukcja opisuje sposób pobierania próbek i tok postępowania, podczas wykrywania obecności włośni (*Trichinella*) w mięsie świń domowych, dzików, koni i innych gatunków zwierząt, według załącznika nr I rozdział I i załącznika nr III do rozporządzenia WE „Referencyjna metoda wykrywania”.

W opisie metody badawczej uszczegółowiono, w stosunku do treści polskiej wersji językowej rozdziału I załącznika nr I i załącznika nr III do Rozporządzenia WE. Wprowadzone zmiany mają charakter porządkujący, nie stanowią zmian merytorycznych metody badawczej opisanej w rozporządzeniu WE i nie mają wpływu na ostateczny wynik badania. Wykonywanie urzędowego badania w sposób opisany w niniejszej instrukcji zapewnia jednolite postępowanie diagnostyczne, niemniej jednak pewne modyfikacje metody są dopuszczalne, ale nie mogą one wpływać na wynik badania.

II. DEFINICJE:

1. metoda MW – oznacza metodę wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem magnetycznego mieszadła wg załącznika nr I rozdział nr I i załącznika nr III do Rozporządzenia WE,
2. miejsca predylekcyjne – oznacza miejsca szczególnie narażone na występowanie włośni,
3. próbka zewnętrzna – oznacza próbkę pobraną w innym miejscu niż miejsce, w którym znajduje się laboratorium do badania mięsa na obecność włośni metodą MW,

III. PRZEDMIOT INSTRUKCJI

Przedmiotem instrukcji jest postępowanie przy wykonaniu badania mięsa na obecność włośni metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody MW wg załącznika nr I rozdział nr I i załącznika nr III do Rozporządzenia WE.

IV. CEL INSTRUKCJI

Celem instrukcji jest uszczegółowienie i ujednoczenie trybu postępowania podczas wykonywania urzędowego badania mięsa na obecność włośni w zakresie:

- pobierania próbek z tusz, jako część badania poubojowego,
- badania próbek mięsa w laboratorium,
- wymagań dotyczących personelu, środowiska oraz wyposażenia laboratorium wykonującego badanie,
- wykonania badania mięsa na obecność włośni metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody MW,
- trybu postępowania w przypadku uzyskania wyników dodatnich oraz wyników wątpliwych,
- sposobu prowadzenia dokumentacji dotyczącej badania metodą MW.

V. PRZEPISY PRAWNE I INNE DOKUMENTY

1. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 853/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r., ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego (Dz. Urz. UE L 139 z 30.4.2004, str. 14-74, z późn. zm.).
2. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 854/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r., ustanawiające szczególne przepisy dotyczące organizacji urzędowych kontroli w odniesieniu do produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi (Dz. Urz. UE L 139 z 30.4.2004, str. 206-320, z późn. zm.).
3. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 882/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r., w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzonych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt (Dz. Urz. UE L 191 z 30.4.2004, str. 200-251, z późn. zm.).

4. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2075/2005 z dnia 5 grudnia 2005 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące urzędowych kontroli w odniesieniu do włośni (*Trichinella*) w mięsie (Dz. Urz. UE L 338 z 22.12.2005, str. 60-82, z późn zm.).
5. Dyrektywa 2003/99/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 17 listopada 2003 r. w sprawie monitorowania chorób odzwierzęcych i odzwierzęcych czynników chorobotwórczych, zmieniająca decyzję Rady 90/424/EWG i uchylająca dyrektywę Rady 92/117/EWG (Dz. Urz. UE L 325 z 12.12.2003, str. 31-40).
6. Ustawa z dnia 26 czerwca 1974 r. Kodeks pracy (Dz. U. 1998 r. Nr 21, poz. 94, z późn. zm.).
7. Ustawa z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej (Dz. U. z 2007 r. Nr 121, poz. 842, z późn. zm.).
8. Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. z 2008 r. Nr 213, poz. 1342).
9. Guideline for the detection of *Trichinella* larvae at the slaughterhouse or connected laboratory in a Quality Assurance System, 2008, opublikowany przez Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne ds. Pasożytów (CRL), Istituto Superiore di Sanità Viale Regina Elena, Rzym, Włochy.
10. Norma PN-EN ISO/IEC 17025 "Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorujących".

Niniejsza instrukcja została opracowana zgodnie z powyższymi przepisami prawa powszechnie obowiązującego. Stosowanie niniejszej instrukcji, nie może prowadzić do naruszenia wspomnianych przepisów. Na przepisy niniejszej instrukcji nie należy powoływać się przy rozstrzyganiu o prawach i obowiązkach podmiotów prywatnych, gdyż nie jest ona dla nich wiążąca.

VI. POBIERANIE PRÓBEK Z TUSZ DO BADANIA NA OBECNOŚĆ WŁOŚNI - ETAP PRZEDLABORATORYJNY

Z każdej tuszy należy pobrać mięśnie z miejsca predylekcyjnego.

1. Świnie:

Masa próbki pierwotnej (z filarów przepony) nie może wynosić mniej niż:

- tusze świni domowej - 2g,
- maciory - 4g,
- knury - 4g.

W przypadku próbek innych niż filary przepony (część żebrowa lub mostkowa przepony, mięśnie zuchwowe, mięśnie języka lub mięśnie brzuszne) masę próbki pobranej do badania należy istotnie zwiększyć.

W przypadku badania kawałków mięsa masa próbki pierwotnej musi być tak zwiększona by umożliwić pobranie w laboratorium próbki o masie nie mniejszej niż 5 g z mięśni prażkowanych o małej zawartości tłuszczu oraz, w miarę możliwości, z miejsca w pobliżu kości lub ścięgien.

W przypadku badania próbek zamrożonego mięsa lub próbek mięśni języka (po usunięciu warstwy wierzchniej, której nie można wytrawić) należy istotnie zwiększyć masę pobranej próbki w takim stopniu by umożliwić pobranie w laboratorium próbki o masie nie mniejszej niż 5g.

2. Dzikie i świniodziki:

Masa próbki pierwotnej pobranej z przedramienia, języka lub przepony nie może być mniejsza niż 10g.

3. Konie:

Masa próbki pierwotnej pobranej z mięśni okołojęzykowych lub z mięśni zuchwowych nie może być mniejsza niż 10g.

W przypadku, gdy brakuje tych mięśni, pobiera się większą próbkę z filaru przepony w przejściu części mięśniowej w część ścięgnistą. Mięsień należy oczyścić z tkanki łącznej i tłuszczu.

4. Inne zwierzęta:

Wszystkie gatunki mięsa dzikich zwierząt łownych innych niż dziki, takich jak niedźwiedzie, mięsożerne ssaki (włączając ssaki morskie) oraz gady bada się, pobierając próbkę z mięśni w miejscach szczególnie narażonych. Miejsca predylekcyjne to:

- u niedźwiedzia: przepona, mięśnie żwaczy i język;
- u morsa: język;
- u krokodyli: mięśnie żwaczy, skrzydłowe i międzyżebrowe;

- u ptaków: mięśnie głowy (np. mięśnie żwaczy i szyi).

Masa próbki pierwotnej pobranej z miejsc predylekcyjnych nie może być mniejsza niż 10g.

W przypadku gdy nie można pobrać próbek z miejsc predylekcyjnych masę próbki pierwotnej należy podwoić.

W przypadku próbek zewnętrznych:

- urzędowy lekarz weterynarii pobierając próbkę wypełnia część pierwszą „Protokołu pobrania próbek do urzędowego badania mięsa na włośnice metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła”, którego minimalną zawartość określa załącznik nr 1,
- urzędowy lekarz weterynarii lub osoba, o której mowa w art. 16 ustawy z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej odbierając próbkę, wypełnia część drugą ww. protokołu.

Próbki zewnętrzne powinny być zabezpieczone i plombowane przez urzędowego lekarza weterynarii pobierającego próbkę.

W przypadku próbek przeznaczonych do badań pobranych w rzeźni, w której znajduje się laboratorium, jak i próbek zewnętrznych, urzędowy lekarz weterynarii lub osoba, o której mowa w art. 16 ustawy z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej odbierając próbkę wypełnia „Rejestr próbek do urzędowego badania mięsa na włośnice metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła”, którego minimalną zawartość określa załącznik nr 2.

Pobraną tkankę mięśniową należy poddać badaniu pod kątem występowania włośni, w laboratorium wyznaczonym przez właściwy organ, przy wykorzystaniu metody wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody MW (Rozporządzenia (WE) art. 2 ust. 1 i 3; rozdział I w Załączniku I i Załącznik III)

VII. BADANIE MIĘSA NA WŁOŚNIE METODĄ WYTRAWIANIA METODĄ WYTRAWIANIA PRÓBKI ZBIORCZEJ Z ZASTOSOWANIEM METODY MAGNETYCZNEGO MIESZADŁA – ETAP LABORATORYJNY

1. Wymagania dotyczące personelu laboratorium

Personel laboratorium wykonujący badania powinien posiadać odpowiednie kwalifikacje i wiedzę z zakresu bezpieczeństwa i higieny pracy.

Ponadto każdy członek personelu laboratorium, który obsługuje wyposażenie, przeprowadza badania lub wzorcowanie, ocenia wyniki, podpisuje sprawozdania, protokoły lub raporty z badań lub świadectwa wzorcowania musi mieć odpowiednie kompetencje. Kompetencje te powinny być kwalifikowane na podstawie właściwego wykształcenia, szkolenia, doświadczenia lub wykazanych umiejętności. Ocena kompetencji personelu laboratorium należy do powiatowego lekarza weterynarii. Minimalne wymagania w zakresie programu szkoleń dla personelu laboratorium określa załącznik nr 3.

2. Wymagania dotyczące warunków lokalowych i środowiskowych

Pomieszczenie/a przeznaczone do wykonywania badania mięsa metodą MW powinny posiadać wyznaczone:

- miejsce/a do przyjmowania próbek do badań,
- miejsce/a, w których wykonywane są badania,
- miejsce/a, w których przechowywana jest dokumentacja.

Pomieszczenie/a powinny być oświetlane światłem naturalnym lub sztucznym, które nie powoduje zmiany barw. W pomieszczeniu/ach, w którym znajduje się trychinoskop powinna istnieć możliwość zaciemnienia. Temperatura w pomieszczeniu/ach do badania powinna być monitorowana. W czasie badania powinna być utrzymana temperatura w zakresie od 18 ° C do 30 ° C. Wyposażenie i infrastruktura pomieszczenia/eń powinny umożliwiać postępowanie przy wykonywaniu badania mięsa, zgodnie z opisem metody MW

i zapewniać wymagane warunki środowiskowe właściwe dla przechowywania wyposażenia, w tym wyposażenia pomiarowego.

Pomieszczenie/a muszą być zabezpieczone, w taki sposób, aby uniemożliwić dostęp osobom postronnym.

3. Wymagania dotyczące wyposażenia oraz odczynników

Laboratorium wykonujące badanie mięsa metodą MW powinno posiadać nizej wymienione wyposażenie oraz odczynniki chemiczne:

Wyposażenie:

- a) waga umożliwiająca pomiar masy w przedziale od 1 g do 115 g z niepewnością pomiaru nie większą niż $\pm 0,1$ g;
- b) odważnik wzorcowy o masie 1g i niepewności odtwarzania masy nie większej niż $\pm 0,01$ g;
- c) termometr o zakresie pomiarowym umożliwiającym pomiar temperatury cieczy od 10°C do 60°C i o niepewności pomiaru temperatury nie większej niż $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
- d) termometr umożliwiający pomiar temperatury pomieszczenia, w którym wykonywane jest badanie, umożliwiający pomiar i rejestrację temperatury w przedziale nie mniejszym niż od 10°C do 40°C z niepewnością nie większą niż $\pm 1^{\circ}\text{C}$, termometr umożliwiający pomiar temperatury w lodówce, w której przechowywana jest pepsyna o zakresie pomiarowym co najmniej od 0°C do 15°C ;
- e) pipety wielomiarowe o pojemności nie mniejszej niż 10 ml, oraz pipety wielomiarowe o pojemności 20 ml lub 25 ml do odmierzenia kwasu solnego 25%, ewentualnie urządzenia do dozowania kwasu z butelki (dozatory butelkowe), stelaże do pipet;
- f) gumowe lub automatyczne gruszki do pipet lub inne przyrządy pipetujące do pobierania kwasu oraz odciągania supernatantu z nad osadu po sedymentacji;
- g) dozowniki lub pipety o pojemności nie mniejszej niż 25 ml (o dokładności odmierzenia nie większej niż 0,5 ml) oraz uchwyty do pipet;
- h) szklane cylindry pomiarowe (klasa B) o pojemności całkowitej nie mniejszej niż 50 ml z podziałką umożliwiającą pomiar objętości w przedziale nie mniejszym niż 10 – 50 ml;
- i) trychinoskop z poziomym pulpitem, zapewniający uzyskanie powiększenia roboczego od 30 do 50 x i powiększenia maksymalnego od 80 do 100 x lub stereomikroskop optyczny z zespołem lusterkowym oraz źródłem światła o regulowanej intensywności, zapewniający uzyskanie powiększenia roboczego od 15 do 20 x i powiększenia maksymalnego od 60 do 100 x, lub inne urządzenie optyczne o wymaganych powiększeniach, umożliwiające wykonanie badań mięsa zgodnie z metodą MW;
- j) czasomierz lub minutnik umożliwiający pomiar czasu w zakresie od 1 do 60 minut;

- k) nożyczki, nóż i pęseta do pobierania próbek;
- l) sita z siatki ze stali nierdzewnej, z oczkami 180 μm , o średnicy zewnętrznej 11 cm z certyfikatem lub tabliczką znamionową, potwierdzającymi parametry siatki;
- m) płytki Petriego o średnicy 9 cm (w przypadku zastosowania stereomikroskopu) z podziałką na pola do badań 10 x 10 mm;
- n) rynienka do liczenia larw (do stosowania z trychinoskopem) wykonana z akrylowych płytek o grubości 3 mm i poniższych parametrach:
 - dno rynienki podzielone na pola o wymiarach 180 x 40 mm,
 - boki o wymiarach 230 x 20 mm,
 - szczyty o wymiarach 40 x 20 mm. Dno i szczyty rynienki umieszczone między jej bokami powinny tworzyć dwa uchwyty na jej końcach. Dno rynienki powinno być podniesione na 7 – 9 mm od podstawy ramy utworzonej przez boki i szczyty. Elementy powinny być połączone odpowiednim dla danego materiału klejem;
- o) tace z oznaczonymi 25, 50 lub 100 polami, z których każde może pomieścić próbki mięsa o masie niezbędnej do wykonywania badania, lub inne wyposażenie zapewniające identyfikowanie pochodzenia próbek;
- p) malakser z ostrym tnącym ostrzem;
- r) mieszadła magnetyczne, z płytką o temperaturze regulowanej termostatem i pokrytymi teflonem prętami mieszającymi o długości ok. 5 cm, mieszadła powinny być dostosowane do typu mieszadła tak, by zapewnić w czasie wytrawiania wirowanie płynu wytrawiającego w całej jego objętości;
- s) pipety jednomiarowe o pojemności nie mniejszej niż 30 ml lub strzykawki jednorazowe z wężykiem o pojemności nie mniejszej niż 60 ml do odsysania supernatantu;
- t) szklane stożkowe rozdzielacze o pojemności nie mniejszej niż 2 litry, w miarę możliwości zaopatrzone w teflonowe zatyczki bezpieczeństwa;
- u) lejki o średnicy wewnętrznej nie mniejszej niż 12 cm do umieszczenia w nich sit;
- w) szklane zlewki o pojemności 3 litrów;
- x) folia aluminiowa (0,02 mm lub 0,03 mm);
- y) naczynia o pojemności od 10 litrów do 15 litrów, do zbierania pozostałego płynu wytrawiającego;
- z) zlew umożliwiający dokładne mycie wyposażenia;
- ż) statywy, pierścienie, uchwyty,
- ż) lodówka do przechowywania pepsyny.

Odczynniki chemiczne:

- a) kwas chlorowodorowy 25 %;
- b) pepsyna o mocy: 1:10.000 NF (Narodowy Receptariusz USA) odpowiadającej 1:12500 BP (Farmakopea Brytyjska) lub 2000 FIP (Międzynarodowa Federacja Farmacji) lub stabilizowana pepsyna płynna – minimum 660j./ml (Farmakopea Europejska);
- c) woda przeznaczona do spożycia przez ludzi, w tym woda wodociągowa;
- d) 90 % alkohol etylowy.

4. Szczegółowe wskazówki dotyczące badania:

- a) waga używana przy pobieraniu próbek powinna być każdorazowo wytarowana przed pobraniem próbki. Przed rozpoczęciem ważenia należy sprawdzić wagę odważnikiem 1g. Wskazania wagi przy sprawdzeniu odważnikiem powinny mieścić w granicach błędów wskazań wagi określonego w świadectwie wzorcowania z uwzględnieniem niepewności pomiarów przy wzorcowaniu wagi i niepewności wzorcowania odważnika;
- b) trychinoskop powinien być poddany przeglądowi przez upoważnioną osobę, zgodnie z harmonogramem;
- c) na kilka minut przed rozpoczęciem badania z użyciem trychinoskopu należy urządzenie włączyć by podgrzać jego elementy optyczne;
- d) po naważeniu pepsyny należy odczynnik zamknąć i odstawić do lodówki;
- e) po zakończeniu sedymentacji należy ostrożnie usunąć płyn znajdujący się nad osadem poprzez odessanie płynu z powierzchni;
- f) mycie i odkażenie należy przeprowadzić po zakończeniu badania, jednakże nie wcześniej niż przed uzyskaniem wyniku badania,
- g) czyszczenie sitek należy wykonać ostrożnie tak by nie uszkodzić ich struktury;
- h) dekontaminację wyposażenia i płynów należy przeprowadzić tylko w przypadku uzyskania wyników dodatnich;
- i) zaleca się by zlew był dostatecznie głęboki tak by umożliwić prawidłowe umycie sprzętu.

5. Badania mięsa na obecność włośni metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła

5.1. Przygotowanie w laboratorium próbek do wytrawiania

Z dostarczonych do badań mięśni przygotować próbki laboratoryjne w następujący sposób:

5.1.1 Świnie

- a) Tusze świni domowej: do badania należy przygotować próbki o masie przynajmniej 1 g z filaru przepony, w przejściu części mięśniowej w część ścięgnistą.

W przypadku dostarczenia do laboratorium próbek innych niż filary przepony z dostarczonych mięśni (z części żebrowej lub mostkowej przepony, lub z mięśni żuchwowych, języka lub z mięśni brzusznych) należy przygotować próbkę o masie przynajmniej 2 g.

- b) Hodowlane maciory i knury: do badania należy przygotować próbki o masie przynajmniej 2 g z filaru przepony, w przejściu części mięśniowej w część ścięgnistą.

W przypadku dostarczenia do laboratorium próbek innych niż filary przepony (od całych tusz) z dostarczonych mięśni (z części żebrowej lub mostkowej przepony, lub z mięśni żuchwowych, języka lub z mięśni brzusznych) należy przygotować próbkę o masie przynajmniej 4 g.

- c) W przypadku badania w laboratorium próbek pobranych z kawałków mięsa należy przygotować próbkę o masie przynajmniej 5 g z mięśni prążkowanych, o małej zawartości tłuszczu oraz w miarę możliwości, z miejsca w pobliżu kości lub ścięgien.

- d) W przypadku badania próbek pobranych z mięsa, które, nie będzie poddane obróbce termicznej lub nie jest przeznaczone do innych rodzajów przetwarzania poubojowego do badania należy przygotować próbkę o masie przynajmniej 5 g.

- e) W przypadku zamrożonych próbek do badania należy pobrać próbkę o masie przynajmniej 5 g z mięśni prążkowanych.

5.1.2 Konie

Wytrawianiu poddaje się próbkę o masie przynajmniej 5 g. W przypadku każdego wytrawiania łączna masa badanych mięśni nie powinna przekroczyć 100 g.

5.1.3 Dziki i świniodziki

Wytrawianiu poddaje się próbkę o masie przynajmniej 5 g. W przypadku każdego wytrawiania łączna masa badanych mięśni nie powinna przekroczyć 100 g.

5.1.4 Inne zwierzęta

Wytrawianiu poddaje się próbkę o masie przynajmniej 5 g (pobrany z miejsc predylekcyjnych). W przypadku braku próbek z miejsc predylekcyjnych wytrawianiu poddaje się próbkę o masie nie mniejszej niż 10 g.

Uwaga:

- Masa próbek mięsa odnosi się do próbki mięsa nie zawierającej tłuszczu i powięzi.
- Przy przygotowaniu próbek mięśnia z języka należy zwrócić szczególną uwagę na uniknięcie pobrania wierzchniej warstwy języka, której nie można wytrawić, co może uniemożliwić odczyt osadu.
- Próbkę o masie powyżej 3 g przed rozdrobieniem za pomocą malaksera należy rozdrobnić za pomocą nożyczek.

5.2. Próbki zbiorcze

Próbkę zbiorczą przygotowaną z próbek indywidualnych w sposób opisany w p. 5.1 poddaje się badaniu zgodnie z p.5.3 lub 5.4.

Na rycinie przedstawiono schemat wykonania badania w kierunku obecności larw włośni metodą MW (załącznik nr 4).

5.3 Badanie próbki zbiorczej o masie 100 g – 115 g

- Do szklanej zlewki o pojemności 3 litrów zawierającej 2,0 litry wody podgrzanej do temperatury od 46°C do 48°C dodaje się $16\text{ ml} \pm 0,5\text{ ml}$ kwasu chlorowodorowego. Zlewkę należy umieścić na podgrzanej płycie grzewczej mieszadła i rozpocząć proces mieszania. Dodać $10 \pm 0,2\text{ g}$ pepsyny lub $30 \pm 0,5\text{ ml}$ pepsyny płynnej.
- Próbkę zbiorczą 100 – 115 g rozdrobnić w malakserze. Rozdrobnione mięso przenieść do 3-litrowej zlewki zawierającej wodę, kwas chlorowodorowy i pepsynę.
- W przypadku, gdy masa próbki zbiorczej wynosi więcej niż 50 g a mniej niż 100 g zaleca się, by zwiększyć masę pojedynczych próbek aż do uzyskania masy 100 g w próbie zbiorczej.
- Wkładkę mieszającą malaksera kilkakrotnie wyplukać w zlewce z płynem wytrawiającym, a pojemnik malaksera przemyć niewielką ilością płynu wytrawiającego w celu usunięcia przyczepionych skrawków mięsa.
- Zlewkę przykryć folią aluminiową.
- Mieszadło magnetyczne należy wyregulować tak, aby utrzymywało stałą temperaturę $44 - 46^{\circ}\text{C}$ podczas całego procesu trawienia. Podczas procesu trawienia płyn wytrawiający musi wirować z dostatecznie dużą prędkością, aby uzyskać głęboki wir (sięgający dna zlewki) bez rozpryskiwania. Wytrawianie należy kontynuować, aż do rozpuszczenia tkanki mięśniowej (od 30 do 60 minut). Następnie należy wyłączyć mieszadło, a płyn wytrawiający przelać przez sito do rozdzielacza sedymentacyjnego.
- Proces trawienia uważany jest za przeprowadzony prawidłowo, jeżeli nie więcej niż 5 % początkowej masy próbki pozostanie na sitku.
- Płyn w rozdzielaczu należy odstawić na 30 minut. Płyn wytrawiający i inne odpady należy pozostawić do chwili zakończenia badania (odczyt' wyników) W przypadku uzyskania wyników dodatnich przeprowadzić postępowanie opisane w pkt. 5.5.
- Po 30 minutach płyn z osadem w ilości 40 – 45 ml spuścić jednym szybkim ruchem do cylindra pomiarowego i odstawić na 10 minut. Następnie należy ostrożnie odessać sklarowaną ciecz nad osadem (supernatant), pozostawiając

w naczyniu 10 ml płynu. Osad przelać do rynienki do liczenia larw lub na płytkę Petriego.

- Następnie cylinder pomiarowy przepłukać 10 ml ciepłej wody, którą dodaje się do osadu w rynience do liczenia larw lub płytce Petriego. Następnie należy zbadać osad pod trychinoskopem lub stereomikroskopem. Badanie należy wykonywać bezzwłocznie. W żadnym wypadku badania nie można odkładać na dzień następny.
- W przypadku wątpliwości w ocenie osadu, należy zastosować powiększenie maksymalne.

5.4 Badanie próbki zbiorczej o masie poniżej 100 g

W razie potrzeby próbkę zbiorczą o masie do 15 g można dodać do próbki zbiorczej o masie 100 g w celu uzyskania całkowitej próbki zbiorczej o masie 115 g i badać je razem jako jedną próbkę zbiorczą.

Próbka zbiorcza o masie większej niż 15 g musi być badana jako oddzielna próbka zbiorcza. Zaleca się, by w takim przypadku zwiększyć masę pojedynczych próbek aż do uzyskania masy 50 g. Dla próbek zbiorczych o masie do 50 g objętość płynu wytrawiającego i pozostałych składników można zredukować do 1 litra wody, 8 ml kwasu chlorowodorowego i 5 g pepsyny lub $15 \pm 0,5$ ml pepsyny płynnej.

Dla próbek zbiorczych o masie powyżej 50 g zaleca się by zwiększyć masę pojedynczych próbek aż do uzyskania próbki zbiorczej o masie 100 g.

Uwaga :

Jeżeli produkty trawienia (w rozdzielaczu) nie zostały zbadane w czasie 30 minut od ich sporządzenia, należy oczyścić je w następujący sposób: Próbkę końcową o objętości około 40 – 45 ml przelać do cylindra pomiarowego i pozostawić na 10 minut. Następnie odessać ciecz sklarowaną nad osadem pozostawiając 10 ml próbki. Tę objętość uzupełnić wodą nadającą się do spożycia przez ludzi do 40 ml. Po upływie kolejnych 10 minut ponownie odessać 30 ml cieczy sklarowanej nad osadem pozostawiając nie więcej niż 10 ml do badania na płytce Petriego lub na rynience do liczenia larw. Cylinder pomiarowy przepłukać 10 ml wody, którą następnie należy dodać do próbki na płytce Petriego lub na rynience do liczenia larw w celu zbadania.

Jeżeli osad w czasie badania jest mętny, próbkę należy przelać do cylindra pomiarowego i uzupełnić wodą do objętości 40 ml, po czym należy zastosować powyższą instrukcję.

Procedurę można powtórzyć od 2 do 4 razy aż do osiągnięcia przez płyn przejrzystości wystarczającej do wykonania wiarygodnego odczytu.

5.5 Postępowanie w przypadku uzyskania wyniku dodatniego lub wątpliwego

W przypadku uzyskania dodatniego lub wątpliwego wyniku badania próbki zbiorczej należy pobrać z każdej tuszy próbki o masie 20 g. Próbki z 5 tusz po 20 g każda należy traktować jako próbkę zbiorczą i poddać badaniu. W ten sposób powinny być przebadane próbki z 20 grup, po 5 tusz każda. W przypadku wykrycia larw włośni w próbce zbiorczej od 5 tusz, od pojedynczych sztuk z grupy pozyskuje się dalsze 50 g próbki i każdą z nich poddaje się oddzielnemu badaniu z zastosowaniem metody z 50 g masą próbki.

Próbki z pasożytami należy zakonserwować w 90 % alkoholu etylowym i przesłać do identyfikacji na poziomie gatunku do wspólnotowego lub krajowego laboratorium referencyjnego.

Po zebraniu pasożytów należy odkazić płyny dodatnie (płyn wytrawiający, ciecz sklarowaną nad osadem, popłuczyny itd.) poprzez podgrzewanie do temperatury wrzenia. Wyposażenie użyte w badaniu, w którym uzyskano wyniki dodatnie należy odkazić (chemicznie).

6. Wyniki badania

6.1 Wyniki badania

Do stwierdzenia obecności larw płytkę Petriego umieścić pod stereomikroskopem, a rynienkę do liczenia larw pod trychinoskopem, który posiada blokadę stolika zmuszającą badającego do oglądania płytki lub rynienki ruchem meandrycznym i rozpocząć badanie przy powiększeniu roboczym. W przypadku wątpliwości należy zwiększyć powiększenie do wartości maksymalnej. Zapisać wynik badania.

6.2 .Sposób wyrażania ostatecznego wyniku badania

W przypadku wyniku ujemnego wynik badania należy sformułować następująco:
„W badanej próbce/ próbkach nie stwierdzono obecności larw włośni”.

W przypadku wyniku dodatniego wynik badania należy sformułować następująco:
„W badanej próbce/ próbkach stwierdzono obecności larw włośni”.

6.3 Uproszczone sprawozdanie z badania

Minimalna zawartość sprawozdania z uwzględnieniem wymagań normy PN-EN ISO/IEC 17025 znajduje się w załączniku nr 5. Załącznik zawiera wszystkie informacje niezbędne do przygotowania wyniku badania dla klienta.

7. Zapisy dokumentujące realizację urzędowego badania mięsa na obecność włośni metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła

7.1 Protokół pobrania próbek w kierunku wykrycia *Trichinella* w mięsie metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody MW.

7.2 Wpis w rejestrze próbek dostarczonych do badania w kierunku wykrycia *Trichinella* w mięsie metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody MW.

7.3. Sprawozdanie z badania zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17025.

VIII .SPIS ZAŁĄCZNIKÓW

Załącznik 1 Minimalna zawartość protokołu pobrania próbek do urzędowego badania mięsa na włośnię metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła.

Załącznik 2 Minimalna zawartość rejestru próbek do urzędowego badania mięsa na włośnię metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła.

Załącznik 3 Minimalne wymagania w zakresie programu szkoleń dla personelu laboratorium – zagadnienia teoretyczne oraz praktyka.

Załącznik 4 Rycina. Schemat wykonania badania mięsa na włośnice metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła.

Załącznik 5 Minimalna zawartość uproszczonego sprawozdania z badania zgodnie z wymaganiami normy PN- EN ISO/IEC 17025.

Załącznik 6 Sprawdzenie możliwości realizacji w warunkach laboratoryjnych metody wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła.

Załącznik 7 Identyfikacja źródeł niepewności metody.

IX. POSTANOWIENIA KOŃCOWE

Instrukcja wchodzi w życie po upływie 5 dni od dnia podpisania.

GEÓWNY LEKARZ WETERYNARI
Jacek Związek

Załącznik nr 1.

Minimalna zawartość protokołu pobrania próbek do urzędowego badania mięsa na włośnię metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła

PROTOKÓŁ POBRANIA PRÓBEK DO BADANIA MIĘSA NA OBECNOŚĆ WŁOŚNI METODĄ WYTRAWIANIA PRÓBKI ZBIORCZEJ Z ZASTOSOWANIEM METODY MAGNETYCZNEGO MIESZADŁA

I Część

1. Imię i nazwisko urzędowego lekarza weterynarii pobierającego próbkę
2. Data i godzina pobrania
3. Nazwa i weterynaryjny numer identyfikacyjny rzeźni/ właściciela próbki¹
4. Adres rzeźni/ właściciela próbki
5. Próbki pobrano od (*wymienić gatunek i rodzaj zwierzęcia, a także wskazać część tuszy, z której pobrano próbki - np. język, przedramię, przepona*)
6. Liczba próbek
7. Nr tusz ubojowych lub inne (nr tacy/nr ubojowy) oznakowanie identyfikujące próbkę wg ustaleń laboratorium
8. Sposób przekazania wyniku badania (np. mail, faks)

II. Część

1. Dane laboratorium (nazwa/adres)
2. Imię i nazwisko urzędowego lekarza weterynarii lub osoby o której mowa w art. 16 ustawy z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej odbierającej próbkę
3. Data i godzina odbioru próbki
4. Informacje dotyczące stanu i sposobu przyjęcia próbki

.....
Podpis pobierającego próbkę

.....
Czytelny podpis dostarczającej próbkę²

.....
Podpis odbierającego próbkę

¹ Należy wpisać weterynaryjny numer identyfikacyjny, jeżeli został nadany.

² Należy wypełnić, gdy osoba dostarczająca próbkę jest inna niż osoba pobierająca lub odbierająca próbkę.

Załącznik nr 2

Minimalna zawartość rejestru próbek do urzędowego badania mięsa na włośnice metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła.

REJESTR DOSTARCZONYCH PRÓBEK DO BADANIA W KIERUNKU WYKRYCIA TRICHINELLA W MIĘSIE METODĄ WYTRAWIANIA PRÓBKI ZBIORCZEJ Z ZASTOSOWANIEM METODY MAGNETYCZNEGO MIESZADŁA¹

1. Lp.
2. Nr zlecenia
3. Data odbioru próbek (data /godzina)
4. Liczba próbek
5. Nazwa i weterynaryjny numer identyfikacyjny rzeźni/ właściciel próbki²
6. Nr tusz ubojowych lub inne (nr tacy/nr ubojowy) oznakowanie identyfikujące próbkę wg ustaleń laboratorium
7. Gatunek i rodzaj zwierzęcia
8. Data rozpoczęcia badania/ data zakończenia badania
9. Nr sprawozdania z badania
10. Osoba wydająca/ przenosząca dane
11. Wynik badania

¹ Opcjonalnie w zależności od systemu przyjętego w laboratorium.

² Należy wpisać weterynaryjny numer identyfikacyjny, jeżeli został nadany.

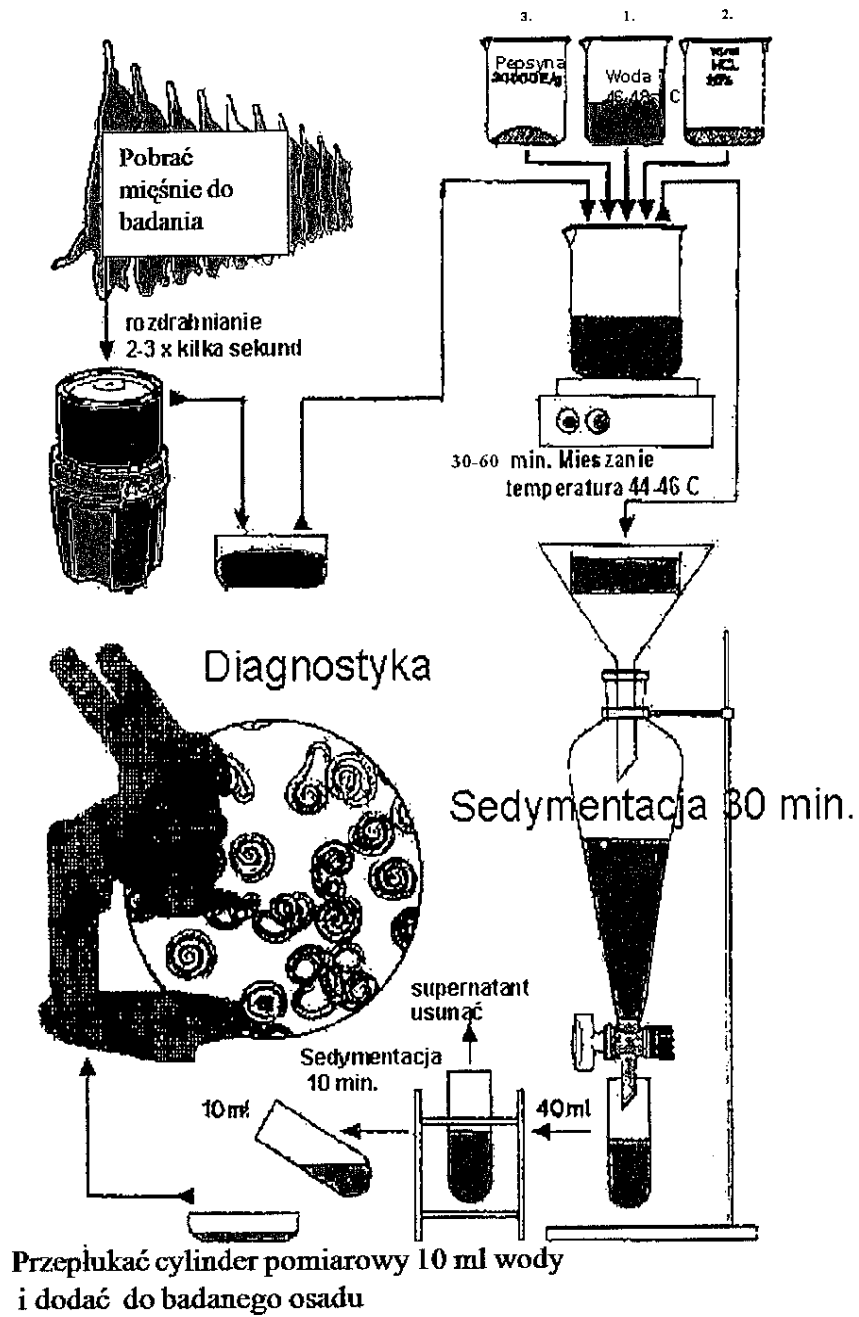
Załącznik nr 3

Minimalne wymagania w zakresie programu szkoleń dla personelu laboratorium –
zagadnienia teoretyczne oraz praktyka.

Lp.	Zagadnienia
1.	Budowa, morfologia i środowisko włóśni oraz różnicowanie gatunku od innych nicieni i niestrawionych elementów próbek (fragmenty tkanki mięśniowej, sierści itp.).
2.	Metoda badania – zajęcia praktyczne
3.	Ocena procedur badania, rejestrowania i analiz stosowanych w laboratorium
4.	System zarządzania zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025
5.	Egzamin sprawdzający wiedzę teoretyczną i umiejętność praktyczne

Załącznik nr 4

Schemat wykonania badania mięsa na włośnice metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła



Minimalna zawartość sprawozdania z badania zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17025.

SPRAWOZDANIE Z BADAŃ nr

1. Nazwa i adres laboratorium:
2. Tytuł sprawozdania:
3. Klient: :
4. Nadesłano przez
5. Nazwa rzeźni i weterynaryjny numer identyfikacyjny rzeźni/ właściciel próbki, kolejny numer w dzienniku badania lub inna przyjęta przez laboratorium identyfikacja¹
6. Data przyjęcia.....
7. Data rozpoczęcia badań:
8. Data zakończenia badań:
9. Rodzaj materiału (*matryca przywołana w zakresie akredytacji*):

Wynik badania:

1. W przypadku wyniku ujemnego wynik badania należy sformułować następująco:
„W badanej próbce/ próbkach nie stwierdzono obecności larw włośni”.
2. W przypadku wyniku dodatniego wynik badania należy sformułować następująco:
„W badanej próbce/ próbkach stwierdzono obecność larw włośni”.

Badanie wykonano zgodnie z :

.....

**NINIEJSZE SPRAWOZDANIE BEZ PISEMNEJ ZGODY LABORATORIUM NIE MOŻE BYĆ POWIELANE INACZEJ NIŻ W CAŁOŚCI.
WYNIKI DOTYCZĄ WYŁACZNIE BADANYCH PRÓBEK**

Uwagi:

Otrzymują

(Autoryzujący sprawozdanie z badań)

¹ Należy wpisać weterynaryjny numer identyfikacyjny, jeżeli został nadany.

Sprawdzenie możliwości realizacji w warunkach laboratoryjnych metody wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszadła

Wytyczne do sprawdzenia możliwości realizacji metody w warunkach laboratoryjnych opracowane na podstawie przewodnika do wykrywania larw włośni p.t.: "Guideline for the detection of *Trichinella* larvae at the slaughterhouse or connected laboratory in a Quality Assurance System", 2008 r., opublikowanego przez Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne ds. Pasożytów (CRL), Istituto Superiore di Sanità Viale Regina Elena, Rzym, Włochy. Metoda zalecana jest do rutynowego stosowania. Wyniki uznawane są za zadowalające jeśli limit wykrywalności wynosi 3 larwy na 100g mięsa i jest osiągany w 75% testów.

W celu sprawdzenia możliwości realizacji metody w warunkach laboratoryjnych należy ocenić i udokumentować następujące cechy charakterystyczne metody: czułość, specyficzność, powtarzalność, odtwarzalność oraz odporność:

- Czułość powinna być równa lub wyższa niż 3-5 larw na 100 g próbki zbiorczej. W tym celu należy do próbki zbiorczej dodać próbkę wzmocnioną (spiked sample) zawierającą znaną liczbę larw. Po wykonaniu trawienia ocenić liczbę stwierdzonych larw włośni.
- Specyficzność powinna być ustalona przez przeszkoloną osobę na podstawie możliwości odróżnienia larw włośni od innych nicieni i ewentualnych artefaktów. W przypadku uzyskania wyników wątpliwych personel wykonujący badanie może wysłać larwy włośni lub „podejrzane larwy” do Krajowego Laboratorium Referencyjnego (KLR).
- Powtarzalność powinna być oceniona przez co najmniej dwukrotne wykonanie badania przez te same osoby, przy użyciu tego samego wyposażenia w tym samym dniu itp.
- Powtarzalność pośrednia powinna być określona poprzez porównanie wyników badania różnych próbek mięśniowych przez różne osoby w różnym czasie, pobrane od różnych zwierząt badanych rutynowo.
- Odtwarzalność powinna być określona na podstawie badań porównawczych przeprowadzonych w grupie uznanych laboratoriów, które muszą wykonać

badania serii minimum 10 próbek zawierających: 1 próbkę negatywną, 3 próbki zawierające 3-5 larw, 3 próbki zawierające 10–20 larw i 3 próbki zawierające 20 – 50 larw.

- Odporność powinna zostać określona w różnych monitorowanych i kontrolowanych warunkach, w celu oceny w jakim stopniu metoda jest odporna na zakłócenia, bez wpływu na wynik (temp. 44-46^oC, objętość dodanego HCL 25% \pm 20%, masa dodanej pepsyny \pm 20%).

Załącznik nr 7
Identyfikacja źródeł niepewności metody

Etap laboratoryjny

L.p.	Składowa niepewności	Źródła
1.	Przygotowanie próbki zbiorczej	<ul style="list-style-type: none"> właściwa masa próbki miejsce predylekcyjne stopień rozdrobnienia próbki
2.	Pepsyna	<ul style="list-style-type: none"> aktywność pepsyny sposób przechowywania pepsyny – odpowiednie warunki temperaturowe ważne terminy przydatności
3.	Sposób przygotowania roztworu wytrawiającego	<ul style="list-style-type: none"> zgodna z metodą kolejność dodawania odczynników
4.	Temperatura procesu wytrawiania	<ul style="list-style-type: none"> przestrzeganie zalecanego zakresu
5.	Sito	<ul style="list-style-type: none"> średnica oczek i stan techniczny sita – brak uszkodzeń mechanicznych
6.	Płyn wytrawiający z wytrawionymi mięśniami	<ul style="list-style-type: none"> brak fragmentów nierozmieszanych
7.	Sedymentacja	<ul style="list-style-type: none"> czas trwania sedymentacji odsysanie supernatantu stabilność statywu z rozdzielaczem prawidłowe zlanie osadu z rozdzielacza (jednym szybkim ruchem) prawidłowe odessanie supernatantu znad osadu przejrzystość osadu do odczytu
8.	Trychinoskop, stereomikroskop optyczny lub inne urządzenie optyczne zgodnie z metodą magnetycznego mieszadła;	<ul style="list-style-type: none"> nieprawidłowe działanie sposób wykonania odczytu regularne przeglądy lub konserwacje wykonane przez upoważniony personel

L.p.	Składowa niepewności	Źródła
9.	Personel upoważniony do wykonywania badań	<ul style="list-style-type: none"> • przeszkolenie z metodyki badawczej • znajomość morfologii włośnia w obszarze trichinoskopowym
10.	Wyposażenie	<ul style="list-style-type: none"> • zachowanie spójności pomiarowej • regularne sprawdzania wag i termometrów