INSPEKCJA WETERYNARYJNA

I N S T R U K C J A

GŁÓWNEGO LEKARZA WETERYNARII

Nr BP.0200.1.2.2021
z dnia 9 lutego 2021 r.

określająca wykonanie badania mięsa na obecność włośni metodą wytrawiania zgodnie z wymaganiami Normy PN EN ISO 18743:2015-11 oraz minimalne wymagania dla laboratoriów wyznaczonych

Luty 2021

Spis treści

1. Wstęp 4
2. Przepisy prawne 6
2.1. Przepisy Unii Europejskiej 6
2.2. Przepisy krajowe 6
2.3. Inne dokumenty 7
3. Definicje 7
4. Zasada metody 8
4.1. Wiadomości ogólne 8
4.2. Masa próbki 9
4.3. Rozdrabnianie 9
4.4. Przygotowanie płynu wytrawiającego 9
4.5. Proces wytrawiania 9
4.6. Filtracja płynu po wytrawianiu 10
4.7. Sedymentacja płynu po wytrawianiu 10
4.8. Badanie mikroskopowe 10
4.9. Potwierdzanie wyników badań 10
5. Odczynniki 11
6. Wyposażenie laboratorium 11
7. Pobieranie próbek, etykietowanie i transport 14
8. Przygotowanie próbki 15
9. Procedura wykonania badania 16
9.1. Schemat wykonania 16
9.2. Rozdrabnianie 16
9.3. Przygotowanie płynu wytrawiającego 16
9.4. Proces wytrawiania 17
9.5. Filtracja płynu po wytrawianiu 17
9.6. Sedymentacja płynu po wytrawianiu w rozdzielaczu 18
9.7. Zbieranie osadu pierwotnego i wtórnego 18
9.8. Badanie mikroskopowe 19
9.9. Badanie zwierząt innych niż świnie 20
10. Dokumentacja 20
11. Przedstawienie wyników 21

12. Środki bezpieczeństwa 21
13. Zapisy dokumentujące realizację urzędowego badania mięsa na obecność włośni metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody MW…….....21
14. Badania biegłości ……21
15. Wymagania podlegające kontroli w laboratoriach wyznaczonych…….22
16 Postanowienia końcowe…….23
17. Załączniki …….24
Załącznik A 24
Próbki pierwotne 24
Próbki wtórne (laboratoryjnej) 24
Załącznik B. 26
Próbki w stanie zamrożenia 26
B.1 Informacje ogólne.....26
B.2 Pobieranie próbek. 26
B.3 Sedymentacja. 26
B.4 Badanie mikroskopowe. 26
Załącznik C. 27
Rys. C.1. Schemat badania próbki zbiorczej 27
Rys. C.2. Włośnie i artefakty 28
Załącznik D (informacyjny) 29
a) Przykład dokumentacji laboratoryjnej (lab nieakredytowane) 29
b) Przykład systemu dokumentacji badań w laboratorium akredytowanym 30
Załącznik E. 33
Załącznik F 34
Identyfikacja źródeł niepewności metody - Etap laboratoryjny 34
Załącznik G 35
Proponowana lista kontrolna do audytu laboratoriów wyznaczonych do wykrywania włośni w mięsie. 35
18.Literatura……41

Niniejsza instrukcja została wydana na podstawie art. 13 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej (Dz. U. z 2018 r. poz. 1557, z późn.zm.).

1. Wstęp

Poniższą instrukcję opracowano w Krajowym Laboratorium Referencyjnym (KLR) w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach na podstawie rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) 2020/1478 z dnia 14 października 2020 r. zmieniającego rozporządzenie wykonawcze (UE) 2015/1375 w odniesieniu do pobierania próbek, metody referencyjnej służącej do wykrywania i warunków przywozu związanych z kontrolą włośnia (*Trichinella*). Zgodnie z rozporządzeniem wykonawczym Komisji (UE) 2015/1375, referencyjna metoda wykrywania włośni, jest zgodna z wymogami normy ISO 18743: 2015-11 i należy uznać je zasadniczo za tożsame. Norma PN-EN ISO 18743: 2015-11 jest nieco bardziej liberalna odnośnie warunków wykonania badania (zwłaszcza warunki temperaturowe) zbliżając się w niektórych przypadkach do tzw. warunków granicznych, których przekroczenie może powodować pogorszenie się parametrów metody. Na przykład niewielkie nawet przekroczenie maksymalnej temperatury wytrawiania wskazanej w normie (47°C) może spowodować zmniejszoną ruchliwość larw włośni i trudności w ich wyszukiwaniu. Z tego względu KLR w instrukcji pozostawia stosowane dotychczasowe, zawężone w stosunku do normy PN-EN ISO 18743:2015-11 parametry. Inne wymagania metody zmienione w stosunku do metody opisanej w Rozporządzeniu UE 2015/1375 dotyczą głównie stosowanego sprzętu i chociaż nie mają charakteru kluczowego dla wykonania badania to dla zachowania zgodności z normą PN-EN ISO 18743:2015-11 należy sukcesywnie wymieniać sprzęt laboratoryjny na wskazany w w/w normie.

W normie PN-EN ISO 18743:2015-11 podano metodę wykrywania larw włośni w mięsie z tusz zwierząt przeznaczonych do spożycia przez ludzi. Metoda ta ma zastosowanie do badania mięsa z gatunków zwierząt domowych i leśnych, podatnych na zarażenie nicieniami z rodzaju *Trichinella*. Przedstawiona instrukcja nie zastępuje normy PN-EN ISO 18743:2015-11 i nie wprowadza zmian merytorycznych do metody badawczej opisanej w tej normie. Wykonywanie urzędowego badania w sposób opisany w niniejszej instrukcji zapewnia jednolite postępowanie diagnostyczne oraz zgodność tego postępowania z w/w normą.

Włośnie (*Trichinella spp.*) są to pasożytnicze nicienie których pełen rozwój odbywa się u jednego żywiciela. Formą dyspersyjną pasożytów są larwy znajdujące się w tkance mięśniowej żywiciela (w formie otorbionej lub nie w zależności od gatunku). Zarażenie następuje na skutek spożycia mięśni zarażonego zwierzęcia w których znajdują się żywe larwy włośni. Wywołują one zoonozę pasożytniczą określaną jako „włośnica", chorobę o często ciężkim przebiegu, zagrażającą zdrowiu i życiu. Zarażenia włośniami stanowią problem ekonomiczny w produkcji trzody

chlewnej. Ze względu na odzwierzęce pochodzenie choroby główne metody zapobiegania skupiają się na kontroli i/lub zwalczaniu włośni u świń, których mięso uważane jest za główne źródło zarażenia ludzi. Badanie mięsa na obecność włośni ma na celu zapobieganie klinicznym objawom włośnicy. Metoda wytrawiania wspomaganego mieszadłem magnetycznym jest uważana za „złoty standard", ponieważ udowodniono, wiarygodność wyników w badaniach walidacyjnych. Metoda ta nie pozwala na określenie gatunku lub genotypu wykrytych larw. Identyfikację gatunku lub genotypu można przeprowadzić metodami molekularnymi.

Metoda opisana w normie PN-EN ISO 18743:2015-11 jest przeznaczona do stosowania w połączeniu z wytycznymi zawartymi w Podręczniku badań diagnostycznych i szczepionek OIE i Międzynarodowej Komisji Włośnicowej (ITC).

Zgodnie z art. 37 ust 1 pkt. 4 lit f. rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. właściwy organ wyznacza jako laboratorium urzędowe wyłącznie laboratorium, które: funkcjonuje zgodnie z normą EN ISO/IEC 17025 oraz otrzymało akredytację krajowej jednostki akredytującej działającej zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 765/2008.

Jednakże zgodnie z art. 40 ust. 1 lit. a rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. laboratoria, których jedyną działalnością jest wykrywanie włośnia w mięsie metodą opisaną w art. 6 rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) 2015/1375 z dnia 10 sierpnia 2015 r. nie mają obowiązku posiadania akredytacji zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025, pod warunkiem, że pozostaną pod nadzorem właściwego organu lub laboratorium urzędowego akredytowanego zgodnie normą PN-EN ISO/IEC 17025 oraz regularnie uczestniczą w międzylaboratoryjnych badaniach porównawczych lub badaniach biegłości organizowanych przez krajowe laboratorium referencyjne i będą osiągać zadowalające wyniki.

W instrukcji uwzględniono minimalne zalecenia dla laboratoriów wyznaczonych, których jedyną działalnością jest wykrywanie włośni w mięsie metodą opisaną w art. 6 rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) 2015/1375 z dnia 10 sierpnia 2015 r.. Zgodnie z art. 40 ust. 1 lit. a rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 2017/625 laboratoria wyznaczone nie mają obowiązku posiadania akredytacji zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025, pod warunkiem, że pozostaną pod nadzorem właściwego organu lub laboratorium urzędowego akredytowanego zgodnie normą PN-EN ISO/IEC 17025.

Wytyczne w zakresie minimalnych zaleceń dotyczących laboratoriów urzędowych wyznaczonych do wykrywania włośni przedstawiono w dokumencie dostępnym na stronie Komisji Europejskiej.

2. Przepisy prawne

Niniejsza instrukcja została opracowana zgodnie z poniższymi przepisami prawa powszechnie obowiązującego, które powinny być brane pod uwagę przy realizacji niniejszej instrukcji. Stosowanie niniejszej instrukcji, jako aktu prawa wewnętrznego, nie może prowadzić do naruszenia powszechnie obowiązujących przepisów. Na przepisy niniejszej instrukcji nie należy powoływać się przy rozstrzyganiu o prawach i obowiązkach podmiotów prywatnych, gdyż nie jest dla nich wiążąca.

2.1. Przepisy Unii Europejskiej:

1. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. w sprawie kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przeprowadzanych w celu zapewnienia stosowania prawa żywnościowego i paszowego oraz zasad dotyczących zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i środków ochrony roślin, zmieniające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001, (WE) nr 396/2005, (WE) nr 1069/2009, (WE) nr 1107/2009, (UE) nr 1151/2012, (UE) nr 652/2014, (UE) 2016/429 i (UE) 2016/2031, rozporządzenia Rady (WE) nr 1/2005 i (WE) nr 1099/2009 oraz dyrektywy Rady 98/58/WE, 1999/74/WE, 2007/43/WE, 2008/119/WE i 2008/120/WE, oraz uchylające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 854/2004 i (WE) nr 882/2004, dyrektywy Rady 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EWG, 96/23/WE, 96/93/WE i 97/78/WE oraz decyzję Rady 92/438/EWG (rozporządzenie w sprawie kontroli urzędowych),
2. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2015/1375 z dnia 10 sierpnia 2015 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące urzędowych kontroli w odniesieniu do włośni (Trichinella) w mięsie (Dz. Urz. UE L 212 z11.8.2015, str. 7–34 z późn. zm.).

2.2. Przepisy krajowe:

1. Ustawa z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej (Dz. U. z 2020 r. poz. 285),
2. Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. z 2020 r. poz. 1421),
3. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 22 kwietnia 2004 r. w sprawie zakresu czynności wykonywanych przez osoby niebędące pracownikami Inspekcji Weterynaryjnej oraz kwalifikacji tych osób (Dz.U. Nr 89, poz. 860).

2.3. Inne dokumenty

Poniższe dokumenty, w całości lub w części, są przywoływane w tej instrukcji i są niezbędne do jej prawidłowego stosowania. W przypadku odniesień z datą obowiązuje tylko cytowana edycja. Dla odwołań niedatowanych, obowiązuje najnowsze wydanie powołanego dokumentu (z uwzględnieniem zmian).

1. Norma PN-EN ISO 18743:2015, - Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Wykrywanie larw włośni *Trichinella* w mięsie metodą wytrawiania,
2. Norma ISO 7218:2007, Mikrobiologia żywności i pasz dla zwierząt - Ogólne wymagania i wytyczne dotyczące badań mikrobiologicznych,
3. Norma PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących,
4. Przewodnik Międzynarodowej Komisji Włośnicowej (ICT), „Quality Assurance in Digestion Testing Programs dla włośni ", Zalecenia i wytyczne. 2012,
5. Podręcznik diagnostyczny Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), rozdział 2.1.16 - „Włośnica", Podręcznik diagnostyczny Testy i szczepionki dla zwierząt lądowych. 7 edycja. 2012,
6. Wytyczne w zakresie minimalnych zaleceń dotyczących laboratoriów urzędowych wyznaczonych do wykrywania włośni (*Trichinella*) w mięsie (https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_legis_guidance_min-recom-trichinella-meat_pl.pdf).

3. Definicje

1. Larwy mięśniowe *Trichinella* spp. (ML) - pierwsze stadium larwalne (L1) nicieni należących do rodzaju *Trichinella*, które znajdują się w mięśniach zwierząt.
2. Metoda wytrawiania (MW) - metoda wykrywania larw włośni w tkance mięśniowej polegająca na rozpuszczeniu tkanki mięśniowej w sztucznym soku żołądkowym w wyniku której zostają uwolnione larw włośni. W kolejnych etapach płyn z larwami poddawany jest filtracji i sedymentacji aż do wykrycia larw pod mikroskopem.
3. Liczba larw włośni w jednym gramie (lpg) - liczba larw *Trichinella* spp. obecnych w jednym gramie badanej tkanki mięśniowej.
4. Próbka zewnętrzna – oznacza próbkę pobraną w innym miejscu niż lokalizacja laboratorium do badania mięsa na obecność włośni metodą MW (próbki dostarczone przez myśliwych lub z uboju gospodarczego).

5. Miejsca predylekcyjne – oznacza miejsca (grupy mięśni) szczególnie narażone na występowanie włośni.
6. Laboratorium – oznacza laboratorium wyznaczone przez Głównego Lekarza Weterynarii zgodnie z art. 25 ust. 4 ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej, do badania mięsa na obecność włośni przy wykorzystaniu metody MW wraz z objętymi tym wyznaczeniem pracowniami badania mięsa na obecność włośni.
7. Europejskie Laboratorium Referencyjnego ds. pasożytów (EURLP) – laboratorium referencyjne Unii Europejskiej, o którym mowa w art. 92 rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r.
8. Krajowe Laboratorium Referencyjne (KLR) - krajowe laboratorium referencyjne, o którym mowa w art. 100 rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r.

4. Zasada metody

4.1. Wiadomości ogólne

Metoda wytrawiania, jest uznaną metodą referencyjną (patrz OIE, Terrestrial Manual 2012, rozdział 2.1.16 - Trichinellosis, str. 307). Zasadą metody jest enzymatyczne rozpuszczenie tkanki mięśniowej w płynie wytrawiającym w skład którego wchodzą pepsyna i kwas solny, w wyniku której zostają uwolnione larwy mięśniowe. Larwy te są odzyskiwane po serii sedymentacji i, o ile konieczne, doczyszczaniu próbki.

Czułość metody wytrawiania warunkowana jest masą próbki (próbki o masie 1 g umożliwią wiarygodne wykrycie zarażenia ≥3 lpg, badanie próbek o masie od 3 g do 5 g umożliwia wiarygodne wykrycie ≥1 lpg). Czułość metody zależy również od innych czynników takich jak rodzaj mięśni wybranych do badania i umiejętności osoby przeprowadzającej badanie. W celu ochrony zdrowia konsumentów laboratorium powinno osiągnąć czułość metody na poziomie od 1 do 3 lpg badanej tkanki mięśniowej. Poziom ten możliwy jest do osiągnięcia pod warunkiem pobrania odpowiedniej masy próbki z miejsc predylekcyjnych. Ze względu na to, że w metodzie wytrawiania wspomaganego mieszadłem magnetycznym nie jest możliwe korzystanie z wewnętrznej kontroli jakości, największe znaczenie dla czułości metody mają opisane poniżej elementy kluczowe.

4.2. Masa próbki

Na potrzeby Inspekcji Weterynaryjnej (IW) z każdej tuszy przeznaczonej do spożycia należy pobrać próbkę z miejsc predylekcyjnych (załącznik A), a masa próbki powinna być oparta na ocenie ryzyka przez właściwy organ, lecz nie może być mniejsza niż 1 g tkanki mięśniowej świń.

4.3. Rozdrabnianie

Próbki tkanki mięśniowej rozdrabnia się za pomocą blendera w celu zwiększenia powierzchni podatnej na działanie enzymu. Procedurę rozdrabniania należy zoptymalizować tak by tempo rozpadu enzymatycznego tkanki mięśniowej było jak największe.

UWAGA: Zbyt małe rozdrobnienie może przyczynić się do spowolnienia procesu wytrawiania podczas gdy zbyt duże rozdrobnienie może prowadzić do uszkodzenia larw.

4.4. Przygotowanie płynu wytrawiającego

Pepsyna jest dostępna w handlu w postaci proszku, granulatu i cieczy. Pepsynę należy przechowywać zgodnie z zaleceniami producenta a jej aktywność musi być potwierdzona certyfikatem i opinią KLR [1]

UWAGA: Zastosowanie płynnej pepsyny minimalizuje ryzyko wystąpienia reakcji alergicznych wśród personelu laboratorium.

4.5. Proces wytrawiania

Żywe larwy włośni są odporne na działanie płynu wytrawiającego (w skład którego wchodzi pepsyna i kwas solny) i dlatego można je odzyskać bez żadnych strat. Martwe larwy włośni mogą zostać uszkodzone w procesie wytrawiania. Aby uzyskać maksymalną skuteczność procesu wytrawiania musi być zachowany odpowiedni stosunek masy tkanki mięśniowej do płynu wytrawiającego 1:20. W trakcie całego procesu wytrawiania należy utrzymywać temperaturę 45±2°C[2]. Czas potrzebny na przeprowadzenie prawidłowego procesu wytrawiania tkanki mięśniowej świń, nie może być krótszy niż 30 minut, jednak w przypadku badania próbek mięśni mniej podatnych na proces trawienia, np.: próbek z tusz macior, tusz dzikich zwierząt, tkanki mięśniowej języka (załącznik A), należy wydłużyć czas trawienia. W przypadku gdy nie zostanie

---

[1] Każda partia pepsyny jest oceniana przez KLR (Opinia o skuteczności trawienia)

[2] Zgodnie z PN-EN ISO 18743:2015-11 temperatura płynu wytrawiającego powinna się mieścić w zakresie 45 ±2°C, jednak zalecany przez KLR zakres wynosi 44-46°C

zatwierdzone inaczej dla konkretnej matrycy, łączny czas wytrawiania nie powinien przekroczyć 60 minut.

UWAGA: Jeśli warunki czasowo-temperaturowe są niższe niż wymagane wartości, może nastąpić niepełne wytrawienie tkanki mięśniowej. I odwrotnie, podwyższona temperatura (powyżej 50°C) lub przedłużony czas wytrawiania mogą spowodować uszkodzenie larw lub inaktywację pepsyny.

4.6. Filtracja płynu po wytrawianiu

Po wytrawieniu płyn przesącza się przez sito o odpowiedniej średnicy oczek umożliwiających swobodny pasaż larw i zatrzymanie niestrawionych resztek tkanek. Sitka powinny być wolne od zanieczyszczeń a przed użyciem należy je wstępnie zwilżyć, aby umożliwić szybki przepływ płynu wytrawiającego. Po zakończeniu filtracji należy sprawdzić czy ilość osadu nie przekracza 5% pierwotnej masy próbki[1].

4.7. Sedymentacja płynu po wytrawianiu

Sedymentacja płynu po wytrawianiu jest procesem, który przebiega w dwuetapowo. Sedymentację pierwotną przeprowadza się w rozdzielaczu stożkowym natomiast sedymentację wtórną w cylindrze miarowym. W obu etapach następuje opadanie i koncentracja larw w osadzie.
Czasy sedymentacji pierwotnej i wtórej wynoszą odpowiednio 30 i 10 minut. Czas sedymentacji martwych larw włośni (np.: zabitych w procesie mrożenia) jest nieco dłuższy (załącznik B).
Jeśli czas sedymentacji jest krótszy niż określono powyżej, nie wszystkie larwy zdążą opaść i nie zostaną znalezione w badanym osadzie.

4.8. Badanie mikroskopowe

Badanie mikroskopowe osadu wtórnego umożliwia doświadczonemu analitykowi rozpoznanie larw włośni i odróżnienie ich od wielu innych nicieni lub artefaktów. Znajomość podstawowych cech morfologicznych larw włośni, w tym ich wielkości (0,7–1,1 mm długości i 0,03 mm szerokości), kształtu i koloru są niezbędne do wykonania badania (patrz rys. C.1 i C.2). Najbardziej charakterystyczną cechą larw włośni, jest budowa stichosomu widoczna pod mikroskopem w postaci szeregu komórek okołogardzielowych wyściełających przełyk i zajmując przednią połowę ciała. Larwy włośni mogą być zwinięte (gdy badany płyn jest zimny) lub ruchliwe (po podgrzaniu), martwe larwy mogą przybierać kształt litery „C”.

---

[1] KLR zaleca ocenę wizualną zamiast wagowej.

Potwierdzeniem kwalifikacji analityka do wykonywania badań urzędowych jest wykonanie badania z użyciem próbek wzbogaconych (udział w badaniach biegłości, badaniach międzylaboratoryjnych) oraz umiejętność identyfikacji larw. Analitycy powinni być kwalifikowani na podstawie wyników uzyskanych w badaniach biegłości zgodnie z wytycznymi ICT.

4.9. Potwierdzanie wyników badań

W przypadku uzyskania wyników pozytywnych lub wątpliwych należy potwierdzić i zidentyfikować larwy na poziomie gatunku. Badanie to powinno być wykonane przez wykwalifikowany personel w laboratorium referencyjnym, zgodnie z dyspozycją zawartą w „Zaleceniach Wytycznych ICT dla zapewnienia jakości w programach badań trawienia włośni ”Część 1 - Zapewnienie jakości w badania rutynowych na obecność włośni”.

5. Odczynniki

1. Woda wodociągowa, podgrzana do temp. około 47°C±2[1]
2. Kwas solny (25%, stężenie molowe: 7,8–7,9 lub inne stężenie)[2].
3. Pepsyna (proszek lub granulat o aktywności: 1: 10.000 NF, 1: 12.500 BP, 2.000 FIP; płynna: 660 U / ml)[3].
4. Etanol (70% do 90% alkoholu etylowego).
5. Podchloryn sodu.[4]

6. Wyposażenie laboratorium

Wyposażenie laboratorium powinno być adekwatne do liczby wykonywanych dziennie badań. W laboratorium powinien być dostępny, co najmniej jeden dodatkowy zestaw do badań. Zaleca się, aby wyposażenie dodatkowe było sprawne i poddawane okresowym przeglądom i konserwacji[5]. W zależności od liczby wykonywanych badań, laboratorium powinno ustalić przybliżony czas zużycia materiałów (np. noży, nożyczek, pęset, ostrzy tnących rozdrabniaczy,

---

[1] KLR zaleca by woda przed badaniem miała temperaturę ok. 48°C

[2] Użycie kwasu solnego technicznego spowoduje destrukcję larw ze względu na obecność resztek kwasu siarkowego.

[3] Każda partia pepsyny w obrocie jest badana przez KLR i posiada opinię o przydatności do badania

[4] Jeżeli do zabicia larw stosuję się gorącą wodę lub podgrzanie to podchloryn nie jest niezbędny. Wadą podchlorynu jest bardzo krótki okres trwałości wynoszący około 1 miesiąca

[5] Zestaw „awaryjny” może znajdować się w powiatowym inspektoracie i być dostępny dla laboratoriów terenowych.

mieszadeł magnetycznych, sit, szkła laboratoryjnego), które należy systematycznie odnawiać lub wymieniać. Zawsze powinien być dostępny ich określony zapas przy czym należy uwzględnić okres pomiędzy zamówieniem a dostawą materiałów. Materiały eksploatacyjne (jednorazowe i odczynniki chemiczne) należy przechowywać w odpowiednich szafkach. Należy cyklicznie sprawdzać terminy ważności odczynników i przechowywać je w warunkach określonych przez producenta. Laboratorium powinno posiadać wykaz kwalifikowanych dostawców usług i materiałów (np. mikroskopów, wag, mieszadeł magnetycznych) oraz podmiotów konserwujących i obsługujących.

Do badania należy używać odczynników, które uzyskały pozytywną opinię Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego i zostały umieszczone w wykazie wyrobów do diagnostyki in vitro stosowanych w medycynie weterynaryjnej, który prowadzi Główny Lekarz Weterynarii. Wykaz wyrobów do diagnostyki in vitro stosowanych w medycynie weterynaryjnej udostępniony jest na stronie administrowanej przez Główny Inspektorat Weterynarii.

Laboratorium powinno być wyposażone w podstawowy sprzęt laboratoryjny zgodnie z normą ISO 7218[1]), w szczególności:

1) oznakowane tacki do pobierania lub plastikowe torebki na próbki;
2) noże, nożyczki do nacinania próbek i usuwania tkanek niepoddających się trawieniu;
3) waga umożliwiająca pomiar masy w przedziale od 1 g do 115 g z dokładnością pomiaru równą 0,1 g;
4) blender szklany, plastikowy lub stalowy z ostrym nożem do siekania (regularnie konserwowany i/lub wymieniany);
5) mieszadło magnetyczne z regulowaną termostatem płytą grzejną lub mieszadło magnetyczne umieszczone w cieplarce;
6) termometry:

a) termometr umożliwiający pomiar temperatury cieczy w zakresie co najmniej od 20°C do 70°C i o dokładności pomiaru temperatury nie gorszej niż 0,5°C;
b) termometr umożliwiający pomiar temperatury pomieszczenia, w którym wykonywane jest badanie, umożliwiający pomiar temperatury w przedziale co najmniej od 10°C do 40°C o dokładności pomiaru nie mniejszej niż 1°C;

[1] PN-EN ISO 7218:2008 Mikrobiologia żywności i pasz -- Wymagania ogólne i zasady badań mikrobiologicznych

c) termometr umożliwiający pomiar temperatury chłodziarce, w której przechowywana jest pepsyna, o zakresie pomiarowym co najmniej od 0°C do 15°C z dokładnością pomiaru nie mniejszej niż 1°C;

7) mieszadełko – tzw. dipol (minimalna długość 5 cm);

8) zlewki szklane (o pojemności minimum 3l);

9) folia aluminiowa lub wieczka do przykrycia górnej części szklanej zlewki;

10) lejki (szklane lub stalowe o średnicy odpowiedniej do średnicy sitek nie mniej jednak niż 15cm)[1];

11) sitka wykonane ze stali nierdzewnej lub mosiądzu, o oczkach o średnicy od 180 µm do 200 µm (średnica sitka około 10 cm lub większa)2;

12) szklane stożkowe rozdzielacze o pojemności co najmniej 2,5 litra, w miarę możliwości zaopatrzone w teflonowe zatyczki bezpieczeństwa.3;

13) cylindry miarowe szklane (50 ml lub 100 ml);

14) szalki Petriego (o średnicy około 90 mm), z naniesioną siatką 1x1 cm, rynienki do liczenia larw lub równoważny sprzęt do liczenia larw. Rynienki do liczenia larw (do stosowania z trychinoskopem) wykonana z akrylowych płytek;

15) stereomikroskop z regulowanym źródłem światła przechodzącego lub trychinoskop z poziomym stołem. Funkcja przechwytywania i przechowywania obrazu (kamera) jest zalecana by udokumentować wyniki wątpliwe, ale nie wymagana;

16) pipety o pojemności 1 ml, 10 ml i 25 ml, ewentualnie urządzenia do dozowania kwasu (dozowniki butelkowe o dokładności odmierzania nie gorszej niż 0,5 ml);

17) fiolki np. eppendorfki do zbierania wyizolowanych larw o pojemności od 1 do 2ml;

18) odważniki wzorcowe o masie 1 g / 50 g / 100 g o klasie nie niższej niż M1;

19) czasomierz lub minutnik umożliwiający pomiar czasu w zakresie od 1 do 60 minut.

UWAGA: Nie zaleca się stosowania plastikowych ani teflonowych zlewek, rozdzielaczy czy lejków ponieważ szorstka powierzchnia i ładunek elektrostatyczny mogą przyczyniać się do przylegania larw do ich powierzchni.

---

[1] Obecnie w laboratoriach stosowane są lejki o średnicy 12cm. KLR proponuje stopniową wymianę lejków na większe.

[2] Mając na uwadze wieloletnie doświadczenie KLR zaleca stosowanie sitek stalowych.

[3] PN-EN ISO 18743:2015-11 zaleca stosowanie rozdzielaczy o pojemności 2,5l (dostępne w handlu rozdzielacze o deklarowanej poj. 2 l w rzeczywistości posiadają pojemność 2,5l lub większą) KLR zaleca sprawdzenie pojemności posiadanych rozdzielaczy i ich stopniowa wymianę..

Wyposażenie laboratorium powinno być regularnie czyszczone i wolne od wszelkich zanieczyszczeń (szczególnie wymienione w pkt. 6.2, 6.4 i 6.11), na którym obecność zanieczyszczeń mogłyby spowodować przywieranie larw lub przeniesienie ich z poprzedniego badania.

UWAGA: Trychinoskop powinien być poddawany przeglądowi przez upoważnioną osobę, zgodnie z harmonogramem jednak nie rzadziej niż 1x rok.

Na kilka minut przed rozpoczęciem badania z użyciem trychinoskopu należy urządzenie włączyć by podgrzać jego elementy optyczne.

7. Pobieranie próbek, etykietowanie i transport

Pobieranie próbek, etykietowanie i transport nie są częścią metody określonej w normie PN-EN ISO 18743:2015, - Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Wykrywanie larw włośni *Trichinella* w mięsie metodą wytrawiania, jednak podstawowe zasady zostały przedstawione w załączniku A. Jeśli nie ma określonych norm międzynarodowych dotyczących pobierania próbek tusz zwierząt lub ich części, zaleca się, aby zainteresowane strony porozumiały się w tej sprawie. W celu uzyskania wymaganej czułości do badania włośni odpowiednią masę próbki mięśni należy pobrać z mięśni predylekcyjnych (załącznik A). Próbki pierwotne mięśni pobrane z tusz do badania metodą wytrawiania powinny mieć masę co najmniej dwukrotnie większą od masy próbki laboratoryjnej (pozwala to personelowi laboratorium na pobranie próbek do badań o odpowiedniej masie wolnych od powięzi i tkanki mięśniowej). Przed przyjęciem próbek do badań, personel laboratoryjny zobowiązany jest sprawdzić przydatność próbki do badań (masę, zawartość, stan, etykietę i zgodność z dokumentami przesyłowymi - zgodnie z PN-EN ISO 7218:2008, 8.3[1]). Próbki mięśni należy zbadać tak szybko, jak to możliwe lub przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C, aby spowolnić rozkład, (należy unikać zamrażania próbek).

Kierownik laboratorium w danym zakładzie powinien:

1) w wyraźny sposób określić odpowiedzialność za identyfikowalność próbek od momentu ich pobrania z tusz do ich przyjęcia w laboratorium;
2) opisać sposób zapewnienia identyfikowalności próbek w laboratorium, od momentu ich przyjęcia w laboratorium po proces zarządzania wynikami badania;
3) zapewnić dowody w odniesieniu do identyfikacji, gromadzenia, indeksowania, dostępności, ewidencjonowania, przechowywania, utrzymywania i usuwania dokumentacji technicznej;

[1] PN-EN ISO 7218:2008 Mikrobiologia żywności i pasz -- Wymagania ogólne i zasady badań mikrobiologicznych

4) przechować zapiski techniczne z badań, dokumentację osobową i kopie wszystkich sprawozdań z badań za dany okres. Dokumentacja dotycząca każdego badania powinna obejmować tożsamość osoby odpowiedzialnej za przeprowadzenie badania i sprawdzenie wyników;
5) przedstawić dowody w postaci wiarygodnego dokumentu wykazującego powiązanie między tuszami, pobranymi próbkami, prowadzeniem badań i wynikami, jak również procedurami zarządzania wynikami dodatnimi zgodnie z rozdziałem II art. 7 „Plany interwencyjne" rozporządzenia wykonawczego (UE) 2015/1375. W dokumentach systemu jakości laboratorium powinno opisać sposób postępowania z próbkami, w tym kryteria ich akceptowalności, ich identyfikację, przechowywanie, dekontaminację i utylizację.

8. Przygotowanie próbki

Próbki laboratoryjne do badań nie mogą zawierać tłuszczu, ścięgien ani powięzi. Jeśli wykonuje się badanie mięśni języka, przed badaniem należy usunąć twardą niestrawną wierzchnią warstwę. Minimalna masa próbki - masa próbki do badania metodą wytrawiania wspomaganego mieszadłem magnetycznym jest określana przez właściwy organ (patrz „Wytyczne ICT Zalecenia dotyczące zapewnienia jakości w programach badań mięsa na obecność włośni metoda wytrawiania", Część 5. Zalecenia dotyczące podstawowych zasad i minimalnych wymagań dotyczących badań włośni program certyfikacji laboratorium - B.6 Pobieranie i postępowanie z próbkami)[1][2]. Pojedyncze próbki można łączyć tak by maksymalna masa mięśni w puli przeznaczonej do trawienia wynosiła 100 g, (dopuszcza się w wyjątkowych sytuacjach zwiększenie masy próbki zbiorczej do 115 g i konsekwentnie w przypadku badania próbki zbiorczej o masie 50 g dopuszczalne jest zwiększenie masy próbki zbiorczej do 57,5 g)[3]. 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.

---

[1] KLR zaleca by z tusz świń pobierać próbki o masie przynajmniej 1g z filarów przepony. Od macior i knurów należy pobrać o masie przynajmniej 2 g z filarów przepony. W przypadku braku filarów przepony pobiera się próbkę o masie dwukrotnie większej – 2 g (lub 4 g w przypadku hodowlanych macior i knurów) z części żebrowej lub mostkowej przepony, lub z mięśni żuchwowych, mięśni języka lub z mięśni brzusznych.

[2] W przypadku badania kawałków mięsa pobiera się próbkę o masie przynajmniej 5 g z mięśni poprzecznie prążkowanych, o małej zawartości tłuszczu oraz, w miarę możliwości, z miejsca w pobliżu kości lub ścięgien. Próbkę o tej samej masie należy pobrać z mięsa, które nie będzie poddawane pełnej obróbce cieplnej, lub nie jest przeznaczone do innych rodzajów przetwarzania poubojowego.

[3] Stanowisko Europejskiego Laboratorium Referencyjnego ds. pasożytów

W przypadku próbki zbiorczej o masie mniejszej niż 50g objętość płynu wytrawiającego i składniki można odpowiednio zmniejszyć do 1 l. Waga używana przy pobieraniu próbek powinna być każdorazowo wytarowana przed pobraniem próbki. Zaleca się sprawdzenie wagi np. odważnikiem 1g. Wskazania wagi przy sprawdzeniu odważnikiem powinny mieścić w granicach błędu wskazań wagi określonego w świadectwie wzorcowania z uwzględnieniem niepewności pomiarów przy wzorcowaniu wagi i niepewności wzorcowania odważnika.

9. Procedura wykonania badania

9.1. Schemat wykonania

Ogólny schemat wykonania badania metodą wytrawiania wspomaganego mieszadłem magnetycznym przedstawiono na rysunku C.1.

9.2. Rozdrabnianie

Aby ułatwić proces rozdrabniania próbek do rozdrabniacza należy dodać niewielką ilość (50 ml do 100 ml na 100g próbki mięśni) płynu wytrawiającego o temperaturze około (45°C ± 2°C)[1]. Proces rozdrabniania należy zakończyć w chwili gdy całe mięso zostanie dokładnie rozdrobnione (zwykle wystarczają trzy cykle rozdrabniania trwające od 5s do 10s). Rozdrabniania nie należy prowadzić zbyt długo ponieważ może ono prowadzić do uszkodzenia larw.

9.3. Przygotowanie płynu wytrawiającego

Pepsyna stosowana do przygotowania płynu wytrawiającego musi posiadać wymaganą aktywność (patrz 5.3). Do każdej analizy należy przygotować świeży płyn wytrawiający. Etap przygotowania płynu wytrawiającego uważa się za punkt krytyczny metody.

1. 16 ± 0,5 ml kwasu chlorowodorowego dodaje się do zlewki o pojemności 3 litrów zawierającej 2,0 litry wody z kranu podgrzanej do temperatury 46–48 °C; w zlewce umieszcza się mieszadełko, zlewkę umieszcza się na podgrzanej płytce grzejnej i zaczyna się proces mieszania[2];
2. Po wstępnym wymieszaniu dodać 10 ± 0,2 g pepsyny (1: 10.000 NF) lub 30 ± 0,5 ml pepsyny płynnej (660 U / ml). [3][4][5][6]

---

[1] KLR zaleca stosowanie płynu wytrawiającego o temp. 44-46°C a nie wody kranowej ponieważ dodatek wody zmienia stężenie roztworu

[2] Tolerancja zaakceptowana przez rozporządzenie (UE) 2020/1478

[3] Tolerancja zaakceptowana przez rozporządzenie (UE) 2020/1478

9.4. Proces wytrawiania

1. Po rozdrobnieniu mięso przenosi się do szklanej zlewki o poj. 3 l, w której znajduje się płyn wytrawiający (patrz 9.3). Ścianki i ostrza rozdrabniacza należy przepłukać czystym płynem wytrawiającym aby zapobiec pozostaniu resztek tkanki mięśniowej. Rozdrabniacz należy przepłukać kilkukrotnie, wszystkie płyny dodać do zlewki.
2. Zlewkę należy przykryć folią aluminiową, aby utrzymać stałą temp. 45±2°C (zalecana temp. 44-46°C) w procesie wytrawiania i zmniejszyć parowanie.[1]
3. Należy regularnie monitorować temperaturę płynu wytrawiającego za pomocą termometru.
4. Upewnić się, że podczas mieszania płyn wytrawiający obraca się z dostatecznie dużą prędkością tak, aby utworzyć głęboki wir jednak bez rozpryskiwania płynu.
5. Proces wytrawiania powinien wynosić minimum 30 min; w razie potrzeby czas trawienia można wydłużyć, nie przekraczając maksymalnego czasu wytrawiania wynoszącego 60 minut.

9.5. Filtracja płynu po wytrawianiu

Przed rozpoczęciem filtracji:

1. Należy upewnić się, że zawór rozdzielacza jest zamknięty. Umieścić wilgotne sitko w lejku i ostrożnie przelać płyn po wytrawianiu (aby uniknąć przelania i rozlania płynu)[2].
2. Następnie przepłukać zlewkę i sitko dodatkową niewielką objętością wody z kranu (minimum 100 ml) w celu spłukania larw przylegających do resztek tkanek lub powierzchni sitka i lejka.
3. Proces wytrawiania uznaje się za zadowalający, jeżeli na sicie znajdują się pozostałości (składające się z powięzi i tkanki łącznej) w ilości nie przekraczającej 5% pierwotnej masy próbki.

---

[4] Kolejność dodawania odczynników do przygotowania płynu wytrawiającego: 1. woda, 2. kwas solny i 3. pepsyna. Zachowanie takiej kolejności zapobiega degradacji pepsyny, w wyniku kontaktu ze stężonym kwasem solnym.

[5]Roztwory podstawowe kwasu solnego są dostępne w handlu również w innych stężeniach niż 25% i mogą one być stosowane pod warunkiem spełnienia uzyskania odpowiedniej koncentracji w roztworze roboczym. Na przykład, jeśli stosuje się 37% roztwór kwasu solnego (stężenie molowe: 12,1) to należy go dodać w ilości 11 ml do 2 l podgrzanej wody wodociągowej.

[6] Norma PN-EN ISO 18743:2015-11 dopuszcza możliwość stosowania pepsyny o innej aktywności, pod warunkiem, że końcowa aktywność w płynie wytrawiającym jest równoważna aktywności 10g pepsyny o mocy 1: 10.000 NF rozpuszczonej w 2l płynu.

[1] KLR zaleca badanie w temperaturze 44-46°C (badania własne).

[2] Norma PN-EN ISO 18743:2015-11

4. Jeśli na sitku pozostają resztki tkanek w ilości przekraczającej 5% pierwotnej masy próbki należy powtórzyć badanie[1].

9.6. Sedymentacja płynu po wytrawianiu w rozdzielaczu

Płyn po wytrawianiu należy pozostawić na 30 minut w rozdzielaczu.

UWAGA: Zaleca się delikatne opukanie ścian rozdzielacza (np. co 10 minut) co ułatwia osiadanie larw na dnie rozdzielacza.

9.7. Zbieranie osadu pierwotnego i wtórnego

1. Po 30 minutach sedymentacji spuścić z rozdzielacza 40 ml płynu (osad pierwotny) do cylindra miarowego starając się otworzyć w pełni zawór rozdzielacza. Całkowite i szybkie otwarcie zaworu zapobiega pozostaniu larw na krawędziach zaworu. W przypadku gdy przepływ jest zbyt słaby larwy mogą pozostać na krawędziach i ściankach rozdzielacza[2]. Jeśli objętość pierwotnego osadu jest zbyt mała, larwy mogą pozostać w płynie w rozdzielaczu i nie znajdą się w badanym preparacie. I odwrotnie, jeśli objętość osadu pierwotnego jest zbyt duża może występować nadmierne zanieczyszczenie utrudniające badanie preparatu. Cylinder miarowy z zebranym osadem w ilości 40 ml odstawić na 10 min. Jeśli czas sedymentacji jest zbyt krótki, larwy mogą nie mieć wystarczająco dużo czasu by opaść na dno cylindra i w efekcie mogą zostać niewykryte. W trakcie sedymentacji należy unikać przemieszczania cylindra miarowego.
2. Po upływie 10 minut należy ostrożnie, stopniowo odessać z powierzchni 30 ml płynu pozostawiając na dnie cylindra miarowego płyn i osad w objętość 10 ml (osad wtórny).
   Jeżeli analityk uzna, że płyn wytrawiający nie jest dostatecznie przejrzysty, aby mógł zostać zbadany, można przeprowadzić doczyszczanie próbki (do 10 ml osadu dodać 30 ml wody wodociągowej, odstawić na 10 min i ponownie odessać 30 ml supernatantu z powierzchni płynu).
4. Osad wtórny należy przelać do rynienki do liczenia larw lub szalki Petriego z naniesioną podziałką. W celu usunięcia larw które mogły pozostać na wewnętrznej powierzchni cylindra miarowego należy go przepłukać 10 ml wody a następnie dodać do badanej próbki.

---

[1] Norma PN-EN ISO 18743:2015-11 dopuszcza dodatkowe wytrawianie pozostałego materiału, to jednak taki sposób postępowania nie zalecany przez KLR.

[2] Sprawdzenie rozdzielaczy zgodnie z zaleceniami KLR

5. Powstałe w ten sposób 20 ml płynu należy wstawić w płytce Petriego lub rynience pod mikroskop/trychinoskop i odstawić na co najmniej 1 minutę by larwy osiadły na dnie przed przystąpieniem do badania mikroskopowego.

9.8. Badanie mikroskopowe

Przed rozpoczęciem badania należy ocenić przejrzystość płynu wytrawiającego za pomocą stereomikroskopu lub trychinoskopu przy powiększeniu od 10x do 20x[1].

Płyn uważa się za dostatecznie przejrzysty jeżeli linie siatki podziałki rynienki lub szalki Petriego są dobrze widoczne. Przejrzystość płynu można również ocenić na podstawie możliwości przeczytania drukowanego tekstu podłożonego pod szalkę Petriego lub rynienkę.

Jeśli osad wtórny nie jest wystarczająco przejrzysty, aby umożliwić łatwą identyfikację larw, należy:

1) do czystego cylindra miarowego przenieść osad wtórny a szalkę lub rynienkę opłukać wodą wodociągową i dodać do osadu wtórnego do całkowitej objętości około 40 ml;
2) pozostawić do sedymentacji na 10 min;
3) ostrożnie pobrać supernatant z powierzchni płynu i pozostawiając objętość 10 ml. Uzyskany osad przenieść do rynienki lub szalki Petriego;
4) przepłukać cylinder miarowy wodą kranową w ilości 10 ml, popłuczyny dodać do badanej próbki;
5) minimalny czas badania produktów trawienia niezależnie czy jest ono wykonywane pod mikroskopem czy trichinoskopem wynosi 10 min.[2] W trakcie badania należy zachować szczególną ostrożność by uniknąć przemieszczania się płynu w badanym preparacie;
6) badanie należy wykonać bezpośrednio po trawieniu; jeśli nie jest to możliwe, rynienka lub szalka Petriego powinna być przechowywana w stanie schłodzonym, a produkty trawienia powinny być zbadane tego samego dnia w którym wykonano wytrawianie;
7) wszystkie próbki, w których podejrzewa się występowanie włośni lub innych pasożytów należy poddać badaniu w powiększeniu od 60x do 100x (załącznik C);

[1] Powiększenie robocze trychinoskopu wynosi 50-60x z możliwością zwiększenia do 80-100x

[2] Norma PN-EN ISO 18743:2015-11 wprowadza minimalny czas badania próbek pod trychinoskopem– 10 minut

8) w przypadku stwierdzenia dodatniego wyniku na obecność włośni, larwy należy jak najszybciej przenieść do probówki eppendorfa o pojemności od 1 ml do 2 ml i uzupełnić 70% - 90% alkoholem etylowym w celu ich konserwacji.[1] [2];
9) .należy przeprowadzić potwierdzającą identyfikację mikroskopową i molekularną (np. mPCR) na poziomie gatunku/genotypu znalezionych larw. Badanie to wykonywane jest przez KLR;
10). w przypadku uzyskania dodatniego lub wątpliwego wyniku badania próbki zbiorczej, z każdej tuszy świńskiej pobiera się dalsze 20 g próbki. Z pobranych próbek (20g) tworzy się próbki zbiorcze po 5 próbek (100g) i poddaje badaniu metodą wytrawiania. W ten sposób należy przebadać 20 próbek zbiorczych, każda składająca się z próbek pobranych z tusz 5 świń. W przypadku wykrycia włośni w próbce zbiorczej od 5 świń, wykonuje się badanie indywidualne pojedynczych sztuk z grupy. W tym celu z każdej podejrzanej tuszy należy pobrać dalsze 50 g próbki i każdą z nich poddaje się oddzielnemu badaniu.[3].

9.9. Badanie zwierząt innych niż świnie

Mięso koni, zwierząt łownych oraz innych gatunków podatnych na zarażenie włośniami musi być poddane badaniu metodą wytrawiania wspomaganego mieszadłem magnetycznym jednak masa próbek pobieranych od tych zwierząt różni się od masy próbek pobieranych z tusz świń.

1. Próbki o masie przynajmniej 10 g pobiera się z mięśni okołojęzykowych lub z mięśni żuchwowych u koni, u dzików z przepony, przedramienia lub języka.
2. W przypadku koni, gdy brakuje tych mięśni, pobiera się większą próbkę z filarów przepony.
3. Próbki o masie przynajmniej 5 g poddaje się badaniu metodą wytrawiania. W przypadku każdego badania łączna masa próbek nie może przekraczać 100 gramów.

---

[1] Próbki z pasożytami należy zakonserwować w alkoholu etylowym i przesłać wraz z pismem przewodnim (zawierającym informacje o zarażonym zwierzęciu i jego miejscu pochodzenia) do identyfikacji na poziomie gatunku na adres:

Krajowe Laboratorium Referencyjne ds. włośnicy.

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, PIWet-PIB w Puławach

Al. Partyzantów 57

24-100 Puławy

tel. (81) 889 3313 lub (81) 889 3314

[2] Po uzgodnieniu z KLR możliwy jest transport próbek mięsa świeżego lub mrożonego.

[3] Sposób postępowania zalecany przez KLR

4. W przypadku uzyskania pozytywnego wyniku badania pobiera się kolejną próbkę o masie 50 g, celem wykonania następnego niezależnego badania.
5. Nie naruszając zasad ochrony gatunków zwierząt, wszystkie gatunki zwierząt łownych innych niż dziki, takie jak niedźwiedzie, mięsożerne ssaki (włączając ssaki morskie) oraz gady, bada się pobierając 10 g próbkę mięśni predylekcyjnych lub, jeżeli nie są dostępne należy zwiększyć masę próbki dwukrotnie.

   Czas trawienia musi być wystarczający, aby zapewnić właściwe trawienie tkanki tych zwierząt, ale nie może przekroczyć 60 minut.

10. Dokumentacja

Laboratoria zobowiązane są do posiadania systemu dokumentacji potwierdzającej, że badanie na obecność włośni zostały wykonane prawidłowo zgodnie z obowiązującym systemem zarządzania jakością.

Przykłady zapisów laboratoryjnych przedstawiono w załączniku D. Zapisy należy prowadzić na bieżąco odnotowując działania wykonane przez analityków i raporty z badań. Arkusze robocze powinny zawierać kluczowe informacje pozwalające na odtworzenie przebiegu badania, potwierdzenie że badanie zostało wykonane przez wykwalifikowany personel, zapisy wszelkich odchyleń i problemów w badaniu oraz pisemny zapis wyników badania. Zapisy te są dokumentem o krytycznym znaczeniu dla audytów jakości i śledzenia realizacji badań (załączniki: E, F i G).

11. Przedstawienie wyników

W sprawozdaniu należy wskazać tylko obecność lub brak larw formułując wynik np.:

„W badanej próbce nie stwierdzono larw włośni”,

„W badanej próbce stwierdzono obecność larw włośni” [1].

W dokumentacji technicznej laboratorium musi natomiast znajdować się informacja o wyniku i masie badanej próbki. W zapisach technicznych w laboratorium w przypadku uzyskania wyniku negatywnego należy sformułować wynik „w badanej próbce/próbkach o masie …. nie stwierdzono larw włośni”. W przypadku wyniku dodatniego „w badanej próbce o masie …. stwierdzono obecność larw włośni”.

[1] EURLP stoi na stanowisku, że w sprawozdaniu końcowym należy wskazać tylko obecność lub brak larw, masę próbki należy podać w dokumentacji technicznej laboratorium.

12. Środki bezpieczeństwa

Płyn wytrawiający i inne płynne odpady pozostawiane są na tacce do chwili zakończenia odczytywania wyników. Płyny (płyny trawienne, płyny po płukaniu itp.), oraz szkło i inny sprzęt, które mogłyby być zanieczyszczone larwami włośni, zaleca się poddać dekontaminacji poprzez podgrzanie do temp. 70°C lub alternatywnie metodami chemicznymi (np. stosując podchlorynem sodu w końcowym stężeniu 0,01% przez minimum 3 godziny) przed myciem.[1]

13. Zapisy dokumentujące realizację urzędowego badania mięsa na obecność włośni metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody MW:

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

14. Badania biegłości

Laboratoria prowadzące badania na obecność larw włośni w mięsie powinny regularnie uczestniczyć w badaniach biegłości organizowanych przez Krajowe Laboratoria Referencyjne i uzyskiwać w nich zadowalające wyniki. W badaniach powinni brać udział pracownicy laboratorium zajmujący się tymi badaniami na co dzień. Częstotliwość udziału w badaniach można ustalać na podstawie wyników uzyskiwanych przez laboratorium w poprzednich badaniach biegłości, zgodnie z opinią Krajowego Laboratorium Referencyjnego. Badanie biegłości powinno obejmować, co najmniej 3 próbki i uznaje się, że zakończyło się ono powodzeniem, jeżeli wszystkie próbki dodatnie są zidentyfikowane jako dodatnie, i odpowiednio ujemne jako ujemne. Krajowe Laboratorium Referencyjne, które zorganizowało badania biegłości przekazuje raport z otrzymanych wyników właściwemu wojewódzkiemu lekarzowi weterynarii. W przypadku niepowodzenia laboratorium powinno przeanalizować jego przyczyny, wdrożyć odpowiednie działania naprawcze i powtórzyć badanie przy użyciu dodatkowych próbek przekazanych przez Krajowe Laboratorium Referencyjne. W przypadku ponownego niepowodzenia laboratorium, Główny Lekarz Weterynarii po otrzymaniu informacji od Krajowego Laboratorium Referencyjnego cofa wyznaczenie laboratorium do wykonywania badań na obecność włośni.

---

[1] Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2015/1375 przewidywało użycie wody o temp. powyżej 65°C

15. Wymagania podlegające kontroli w laboratoriach wyznaczonych

W instrukcji uwzględniono minimalne zalecenia dla laboratoriów wyznaczonych, których jedyną działalnością jest wykrywanie włośnia w mięsie metodą opisaną w art. 6 rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) 2015/1375 z dnia 10 sierpnia 2015 r. Zgodnie z art. 40 ust. 1 lit. a rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. laboratoria wyznaczone jedynie do wykonywania badań na obecność włośni nie mają obowiązku posiadania akredytacji zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025, pod warunkiem, że pozostaną pod nadzorem właściwego organu lub laboratorium urzędowego akredytowanego zgodnie normą PN-EN ISO/IEC 17025, (załącznik G).

Zgodnie z art. 24 ust. 2 ustawy z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej (Dz. U. z 2018 r. poz. 1557, z późn. zm.) pomieszczenie, w którym jest przeprowadzane badanie laboratoryjne mięsa na obecność włośni, zwane dalej „pracownią badania mięsa na obecność włośni", powiatowy inspektorat weterynarii wyposaża w odczynniki i sprzęt niezbędny do prawidłowego przeprowadzenia tego badania, zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) nr 1375/2015 z dnia 10 sierpnia 2015 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące urzędowych kontroli w odniesieniu do włośni (*Trichinella*) w mięsie.

Zgodnie z art. 24 ust. 3 ustawy z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej (Dz. U. z 2018 r. poz. 1557, z późn. zm.) kierownik zakładu higieny weterynaryjnej lub osoba przez niego upoważniona kontroluje, czy w pracowni badania mięsa na obecność włośni są spełnione wymagania w zakresie systemu zarządzania.

W załączniku G zostały opisane szczegółowe parametry podlegające kontroli, które mają ułatwić Inspekcji Weterynaryjnej nadzór nad pracowniami badania mięsa na obecność włośni. Raport z przeprowadzonej kontroli oraz spostrzeżenia i wprowadzone działania naprawcze należy przesłać do wojewódzkiego lekarza weterynarii.

16. Postanowienia końcowe

1. Traci moc instrukcja Głównego Lekarza Weterynarii GIWpr.0200.1.20.2020 z dnia 20 lipca 2020 r. określającą postępowanie przy wykonywaniu urzędowego badania mięsa na włośnie metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem metody magnetycznego mieszania na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) 2015/1375 oraz minimalne wymagania dla laboratoriów wyznaczonych.
2. Instrukcja wchodzi w życie z dniem podpisania.

Zatwierdził:

Bogdan Konopka

/podpisano elektronicznie/

17. Załączniki:

Załącznik A

Mięśnie predylekcyjne

Aby uzyskać pożądaną czułość w badaniach na obecność włośni u zwierząt domowych lub dzikich, do badania należy pobrać próbkę o odpowiedniej masie z mięśni predylekcyjnych typowych dla danego gatunku.

W tabeli 1 przedstawiono listę gatunków zwierząt i odpowiadające im mięśnie predylekcyjne. Masa próbki powinna zostać określona przez właściwy organ w oparciu o ryzyko wystąpienia włośni w tuszach badanych zwierząt, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy na temat badania i celu badania.

Tab.1 Gatunek zwierzęcia i mięśnie predylekcyjne dla larw włośni

Gatunek zwierzęcia	Mięśnie predylekcyjne
Świnia (*Sus scrofa f. domestica*)	filary przepony, mm. szczękowe
Koń (*Equs f. caballus*)	mm. szczękowe, filary przepony, mm. języka
Dzik (*Sus scrofa*)	filary przepony, mm. przedramienia, mm. języka
Pies (*Canis lupus familiaris*)	filary przepony, mm. szczękowe, mm. języka
Niedźwiedź (*Ursus spp.*)	filary przepony, mm. szczękowe, mm. języka
Mors (*Odobenus spp.*)	mm. języka
Foka (rodzina *Phocidae*)	filary przepony, mm. międzyżebrowe, mm. języka
Krokodyl (*Crocodylus niloticus*)	mm. międzyżebrowe
Lis (*Vulpes* spp.)	filary przepony, mm. przedramienia, mm. języka
Jenot (*Nyctereutes procyonoides*)	filary przepony, mm. przedramienia, mm. języka

Próbki pierwotne

Próbka pierwotna to próbka tkanki mięśniowej pobranej bezpośrednio z tuszy i dostarczona do laboratorium. Z próbki pierwotnej analityk pobiera próbkę laboratoryjną pozbawioną tkanki łącznej, tłuszczu i powięzi. Niezależnie od gatunku badanego zwierzęcia zaleca się by masa próbki pierwotnej (z której w laboratorium zostanie wycięta próbka wtórna) była co najmniej 2x większa niż masa próbki laboratoryjnej.

Zaleca się pobranie próbek pierwotnych w przejściu części mięśniowej w część ścięgnistą.

Masa próbek pierwotnych nie może wynosić mniej niż:

- tusze świni - 2 g,
- tusze macior i knurów - 4 g,
- tusze koni - 10°g,
- tusze dzików - 10°g,
- inne gatunki - 10 g.

Próbki wtórne (laboratoryjnej)

Masa próbek wtórnych pobranych z miejsc predylekcyjnych nie może wynosić mniej niż:

- tusze świni - 1 g,
- tusze macior i knurów - 2 g,
- tusze koni - 5°g,
- tusze dzików - 5°g,
- inne gatunki - 10 g.

W przypadku braku próbek pobranych z miejsc predylekcyjnych konieczne jest zwiększenie masy badanych próbek[1] [2] [3] [4]:

[1] W przypadku braku próbek z miejsc predylekcyjnych masę próbki wtórnej należy zwiększyć co najmniej 2 krotnie.

[2] W przypadku kawałków mięsa pobiera się próbkę o masie przynajmniej 5 g z mięśni poprzecznie prążkowanych, o małej zawartości tłuszczu oraz, w miarę możliwości, z miejsca w pobliżu kości lub ścięgien.

[3] W przypadku badania próbek zamrożonego mięsa lub próbek mięśni języka (po usunięciu warstwy wierzchniej, której nie można wytrawić) próbki o masie nie mniejszej niż 5 g.

[4] Zaleca się zwiększenie masy próbek do 5°g z tusz świń z których mięso zostanie przeznaczone do produkcji wędlin surowych.

Załącznik B

Próbki w stanie zamrożenia

B.1 Informacje ogólne

Próbki mięśni zwierząt (pozyskane np. w ramach monitoringu zwierząt wolnożyjących), których nie można zbadać bezpośrednio po pozyskaniu można utrzymać przez kilka dni w stanie schłodzenia. Jeżeli nie jest to możliwe należy je zamrozić (−20°C) do czasu badania. Chociaż zamrażanie nie jest zalecane jednak w przypadku niektórych badań (np. lisy pozyskane na obszarach endemicznych dla *Echinococcus multilocularis*), tusze wymagają zamrożenia przed badaniem. Zamrażanie zabija większość gatunków i genotypów włośni. Tylko niektóre mają częściową lub całkowitą odporność na zamarzanie (np. *T. nativa*). Wyniki badań eksperymentalnych pokazują, że martwe larwy wolniej opadają w trakcie sedymentacji z powodu zmiany ich gęstość i kształtu (od zwiniętych do C-kształtnych). Dlatego czas sedymentacji powinien być wydłużony w przypadku mrożonych próbek mięśni, jednak dłuższy czas sedymentacji może skutkować zwiększoną ilością zanieczyszczeń w osadzie. Metoda wytrawiania może być stosowana do zamrożonych próbek z następującymi modyfikacjami punktów (patrz B.2 do B.4).

B.2 Pobieranie próbek

Masę zamrożonych próbek badanych metodą wytrawiania należy zwiększyć, aby skompensować ubytek czułość metody, ponieważ zamrażanie może wpływać na wyniki badania. Gatunki włośni które nie są odporne na zamrażanie mogą zostać zabite i zniszczone w procesie trawienia.

B.3 Sedymentacja

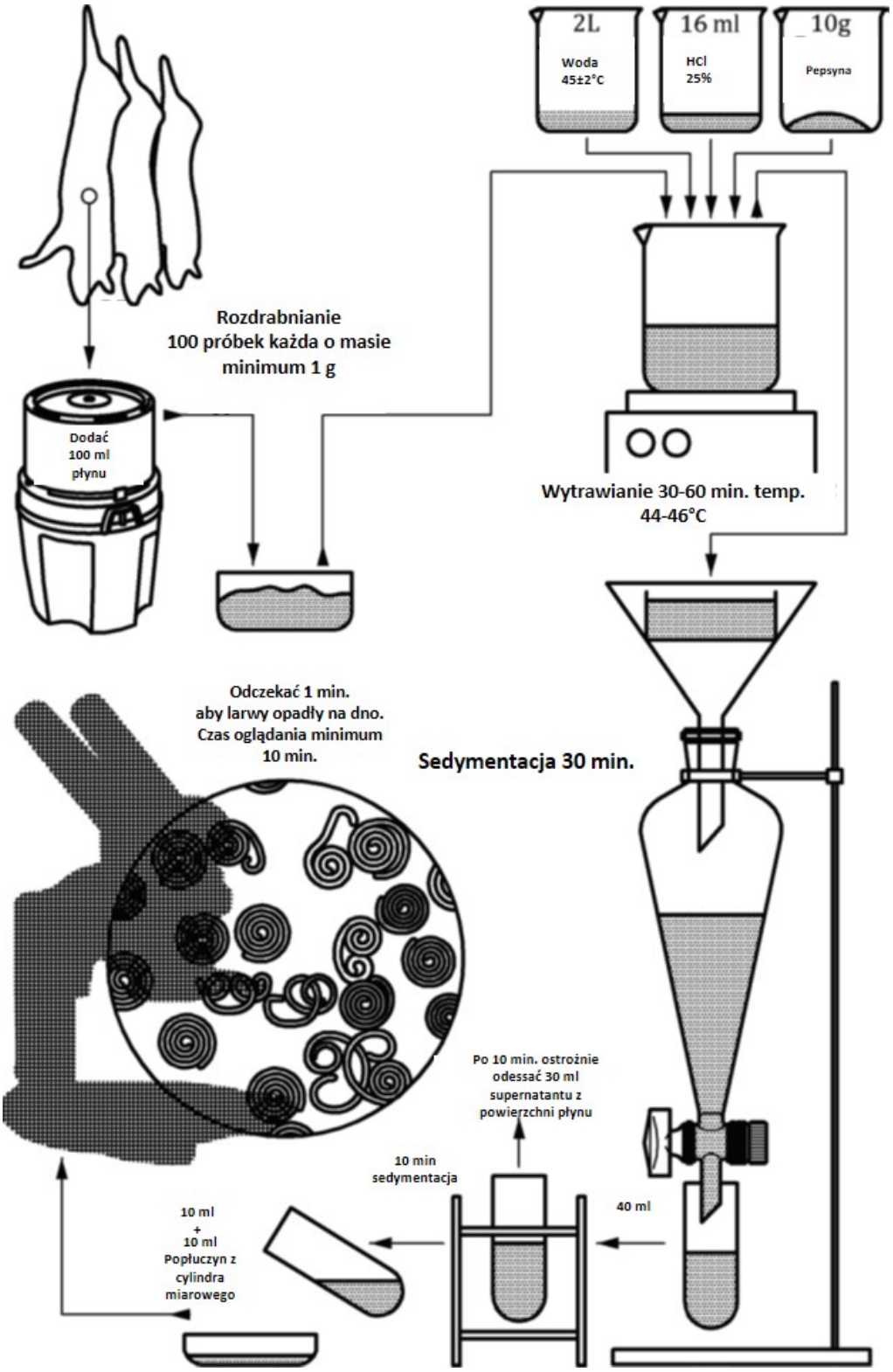
W zamrożonych mięśniach larwy gatunków *Trichinella* wrażliwych na niskie temperatury prawdopodobnie zostały zabite. Gdy martwe larwy rozwijają się po uwolnieniu z tkanki mięśniowej, ich tempo opadania w procesie sedymentacji spada. W związku z tym czas sedymentacji (patrz 9.6) powinien być przedłużony do 60 min.

B.4 Badanie mikroskopowe

Martwe larwy mogą być rozwinięte i przezroczyste; dlatego ich wykrycie pod mikroskopem jest trudne i szczególną uwagę należy zwrócić na badanie płynu wytrawiającego na szalce Petriego. W martwych larwach szybko następuje degradacja DNA, uniemożliwiając często identyfikację molekularną larwy na poziomie gatunku lub genotypu.

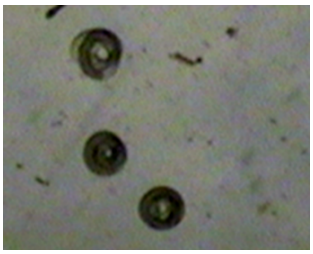
Załącznik C.

Rys. C.1. Schemat badania próbki zbiorczej

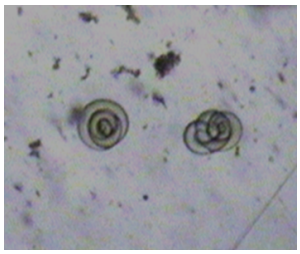


Rys. C.2. Włośnie i artefakty

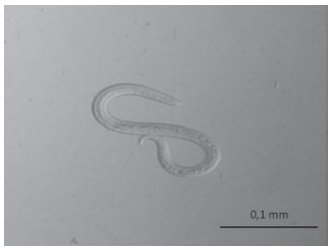
1. Żywe larwy włośni (ruszające się) w ciepłym płynie



2. Żywe larwy włośni w zimnym płynie

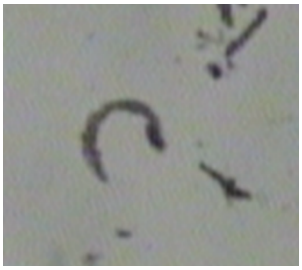


3. Martwe larwy włośni (przeźroczyste)

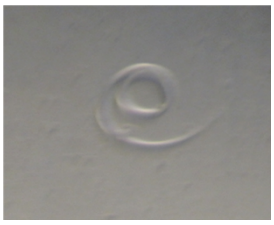


4. Larwa *Toxocara* sp

5. Nicień *Metastrongylus* sp



6. Artefakt - niestrawione włókienka mięśniowe



7. Martwa larwa (kształt litery C)

8. Artefakt – niestrawione włókienka mięśniowe

Załącznik D (informacyjny)

a) Przykład dokumentacji laboratoryjnej (lab nieakredytowane).

Procedura:	Pepsyna seria:	Opakowanie:

Próbka [g]	Świnia [g]	Koń [g]	Dzik [g]i	Inne gatunki [g]	Czas trawienia	Pozostałość po trawieniu [g]	Ujemne	Wątpliwe pozytywne	Liczba larw w na 1g

b) Przykład systemu dokumentacji badań w laboratorium akredytowanym

(strona tytułowa)

REJESTR BADAŃ/SPRAWOZDAŃ

Legenda

Oznaczenie gatunku: T- tucznik; D- dzik; M-maciora; K – knur; I – inne
Sposób identyfikacji próbek (opis)……
Kryteria przyjęcia próbek (opis)……
Identyfikowalność, odpowiednia wielkość próbki pierwotnej, właściwe dla gatunku miejsca predylekcyjne:
T- tak, N-nie (należy opisać przyczynę)
Kryteria sprawdzania wagi (opis)……
Ocena skuteczności wytrawiania…(Masa pozostałości na sicie <5% początkowej masy próbki -T / >5% początkowej masy próbki –N)
Podpisy wg wzoru podpisów
W przypadku jeśli czynności wykonywane są przez różnych analityków należy zidentyfikować osoby

REJESTR PRZYJĘCIA PRÓBEK					BADANIE PRÓBKI ZBIORCZEJ					
Lp	Właściciel Imię, nazwisko Firma (Weterynaryjny Numer Identyfikacyjny) Nr. zlecenia	Identyfikacja próbek	Data, godzina dostarczenia próbek Osoba dostarczająca próbki	Stan próbek do badań zgodny z kryteriami **(T/N) Podpis osoby przyjmującej próbki do badań	Data Godzina rozpoczęcia badania	Warunki środowiskowe/ Monitoring temp w lodówce Min/mx I badania danego dnia	Przygotowanie próbki zbiorczej			Przygotowanie płynu wytrawiającego
							Sprawdzenie wagi (nr wagi/odczyt)	Liczba i masa naważonych próbek jednostkowych [g]	Masa próbki zbiorczej [g]	Objętość wody [l]/ kwasu solnego [ml]/ masa pepsyny [g]
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Badania wykonano zgodnie z Normą PN-EN ISO 18743:2015-11 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego -Wykrywanie larw włośni Trichinella w mięsie metodą wytrawiania

BADANIE PRÓBKI ZBIORCZEJ							Wynik badania			Uwagi
Wytrawianie		Ocena skuteczności wytrawiania	Czas sedymentacji I/ czas sedymentacji II	Doczyszczanie jeśli konieczne (tak- ile razy/ nie)	Trichinoskop nr	Godzina zakończenia badania	Wynik badania: W badanej próbce nie stwierdzono larw włośni/ W badanej próbce stwierdzono obecność larw włośni w ilości x/g	Podpis osób wykonujących badanie (czynności z rubryk 3-4…)	Podpis osoby autoryzującej badanie	
Termometr nr Temperatura trawienia (min/ max)	Czas trawienia (minuty)									
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22

Załącznik E.

Sprawdzenie metody:

1. Czułość metody wytrawiania warunkowana jest masą próbki (próbki o masie 1 g umożliwią wiarygodne wykrycie zarażenia ≥3 lpg, badanie próbek o masie od 3 g do 5 g umożliwia wiarygodne wykrycie ≥1 lpg). Należy przyjąć założenia walidacyjne metody wskazujące na prawidłowość prowadzonych badań, gdy 75% laboratoriów jest w stanie wykryć 1 larwę włośnia w próbkach na poziomie limitu detekcji metody.[1]
2. Specyficzność powinna być oceniana jako zdolny do odróżnienia larw włośni od innych larw nicieni lub artefaktów, które mogą znajdować się w osadach po wytrawianiu (można skorzystać z wyników badań PT lub międzylaboratoryjnych organizowanych przez KLR lub koordynatora).
3. Należy ocenić pośrednią powtarzalność, porównując wyniki uzyskane przez różnych techników, w różnych dniach, z różnymi próbkami mięśni.
4. Określić granicę wykrywalności (wyniki badań PT).
5. Odtwarzalność powinna być oceniana poprzez udział w badaniach biegłości co pozwala ocenić, czy badanie daje takie same wyniki w różnych laboratoriach z różnymi analitykami z zachowaniem parametrów wymaganych w opisie metody.
6. Odporność należy oceniać, zmieniając w kontrolowany sposób warunki wytrawiania, aby ocenić, na ile metoda odporna jest na zmianę warunków bez wpływu na wynik.

---

[1] Dla każdego województwa KLR prowadzi badania PT w tym oceny systemu wskazujące na prawidłowość prowadzonych badań, gdy 75% laboratoriów jest w stanie wykryć 1 larwę włośnia w próbkach na poziomie limitu detekcji metody.

Załącznik F

Identyfikacja źródeł niepewności metody - Etap laboratoryjny

L.p.	Składowa niepewności	Źródła
1.	Przygotowanie próbki zbiorczej	właściwa masa próbki miejsce predylekcyjne stopień rozdrobnienia próbki
2.	Pepsyna	aktywność pepsyny sposób przechowywania pepsyny – odpowiednie warunki temperaturowe ważne terminy przydatności
3.	Sposób przygotowania roztwory wytrawiającego	zgodna z metodą kolejność dodawania odczynników, temp. odczynników
4.	Temperatura procesu wytrawiania	przestrzeganie zalecanego zakresu
5.	Sito	średnica oczek i stan techniczny sita – uszkodzenia mechaniczne brak uszkodzeń mechanicznych
6	Płyn wytrawiający z wytrawionymi mięśniami	brak fragmentów nierozmieszanych
7.	Sedymentacja	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 mieszania;	nieprawidłowe działanie sposób wykonania odczytu regularne przeglądy lub konserwacje wykonane przez upoważniony personel
9.	Personel upoważniony do wykonywania badań	przeszkolenie z metodyki badawczej znajomość morfologii włośnia w obrazie trichinoskopowym
10.	Wyposażenie	zachowanie spójności pomiarowej, regularne sprawdzania wag i termometrów,

Załącznik G

Lista zagadnień do skontrolowania laboratoriów wyznaczonych do wykrywania włośni w mięsie.

SPRAWDZENIE	DOWODY		UWAGI
	TAK	NIE	
1. System zarządzania			
1.1. Czy laboratorium badawcze posiada wdrożony system zarządzania?			
1.2. Procedury operacyjne badawcze normy itd.			
1.3. Instrukcje			
1.4. Powiązane dokumenty (formularze, dokumenty rejestracyjne itp.)			
1.5. Czy w laboratorium wyznaczono osobę odpowiedzialną za procedury administracyjne, obejmujące zakup chemikaliów, materiałów eksploatacyjnych i urządzeń?			
1.6. Czy w laboratorium wyznaczono osobę odpowiedzialną za powiadamianie właściwego organu o wykryciu próbki z wynikiem dodatnim?			
1.7. Czy dostępne są dane kontaktowe właściwego organu i krajowego laboratorium referencyjnego (np. telefon, e-mail)?			
2. Personel			
2.1. Czy w laboratorium wyznaczono osobę nadzorująca jego działalność lub kierująca nim?			
2.2. Czy osoba nadzorująca lub kierująca laboratorium: • posiada uprawnienia do zarządzania działalnością prowadzoną przez laboratorium?			
• jest uprawniona do podpisywania sprawozdań z badań?			
• posiada wiedzę w zakresie morfologii, epidemiologii, biologii i diagnostyki nicieni z rodzaju *Trichinella* oraz wymogów prawa, jak również doświadczenie w zakresie wykrywania larw włośni w mięsie?			
• posiada doświadczenie w dziedzinie bezpośredniej diagnostyki zarażeń włośniami u zwierząt podatnych na zarażenie?			
2.3. Czy pracownicy techniczni posiadają			

podstawową wiedzę dotyczącą pasożytów włośni i ich morfologii?			
2.4. Czy pracownicy techniczni mają udokumentowane doświadczenie w prowadzeniu badań na obecność larw włośni w mięsie?			
3. Metoda(-y) badań			
3.1. Czy laboratorium metodę wytrawiania?			
3.2. Czy laboratorium zweryfikowało, że może odpowiednio stosować tę metodę / te metody?			
3.3. Czy jest dostępna dokumentacja procesu weryfikacji?			
3.3.1. Czy obejmuje ona: • Liczbę przeprowadzonych badań			
• Pochodzenie próbki (np. Krajowe Laboratorium Referencyjne, Laboratorium Referencyjne WE ds. pasożytów)			
• Analizę statystyczną			
• Ocenę wyników			
3.4. Czy laboratorium posiada materiał odniesienia (larwy włośni przechowywane w odpowiednich środkach konserwujących, zdjęcia larw o różnych kształtach)?			
4. Pomieszczenia laboratoryjne			
4.1. Czy laboratorium stosuje wytyczne dla drugiego poziomu bezpieczeństwa biologicznego?			
4.2. Jeżeli nie, to czy pomieszczenia laboratorium są odpowiednie do prowadzenia badań i do zapewnienia bezpieczeństwa pracowników?			
4.3. Czy wprowadzono odpowiedni system utylizacji odpadów, płynu wytrawiającego oraz skrawków mięsa?			
5. Wyposażenie			
5.1. Czy wyposażenie laboratorium jest odpowiednie do liczby wykonywanych badań w ciągu dnia / tygodnia?			
5.2. Czy na wypadek sytuacji kryzysowych dostępny jest co najmniej jeden zapasowy zestaw do badania?			
5.2.1. Czy zasoby te są utrzymywane w stanie sprawności i czy prowadzona jest ich okresowa konserwacja?			
5.3. Czy laboratorium ustaliło czas zużycia materiałów (np. noży, nożyczek, pincet, ostrzy tnących mikserów, mieszadeł magnetycznych, sit, szklanych pojemników)?			

5.3.1. Czy materiały te są okresowo odnawiane i czy dostępny jest zawsze ich określony zapas?			
5.4. Czy materiały eksploatacyjne (jednorazowe i odczynniki chemiczne) są przechowywane w odpowiednich szafkach?			
5.4.1. Czy dostępny jest ich odpowiedni zapas, przy uwzględnieniu okresu pomiędzy zamówieniem a dostawą materiałów?			
5.5. Czy sprawdzany jest cyklicznie termin ważności odczynników ?			
5.6. Czy pepsyna i kwas chlorowodorowy są przechowywane w warunkach określonych przez producenta?			
5.7. Czy laboratorium posiada listę kwalifikowanych dostawców usług i materiałów (np. w odniesieniu do mikroskopów, wag, mieszadeł magnetycznych)?			
6. Postępowanie z próbkami			
6.1. Czy laboratorium posiada dokument systemu zarządzania opisujący sposób postępowania z próbkami, kryteria ich akceptowalności, identyfikacji, przechowywania, odkażania i utylizacji?			
6.1.1. Czy laboratorium wykonuje badania próbek niespełniających ustalonych kryteriów (np. z małą ilością tkanki mięśniowej, bez kodu identyfikacyjnego)?W jaki sposób?			
6.2. Czy kryteria akceptowalności wypełniają wymogi określone w rozporządzeniu (WE) 2015/1375 (rozdział II art. 2 „Pobieranie próbek z tusz” oraz załącznik III „Badanie zwierząt innych niż świnie”)?			
6.3. Czy dostęp do laboratorium jest kontrolowany?			
7. Identyfikowalność			
7.1. Czy laboratorium posiada dokument systemu zarządzania obejmujący identyfikowalność próbek od ich pobrania z tusz do sprawozdania z badania?			
7.2. Czy próbki są jednoznacznie identyfikowalne?			
7.3. Czy zapewniono łączność między próbkami, sprawozdaniami z badań i klientem?			
7.4. Czy istnieją dowody w odniesieniu do identyfikacji, gromadzenia, indeksowania, dostępności, ewidencjonowania,			

przechowywania, utrzymywania i usuwania dokumentacji technicznej?			
7.5. Czy zachowuje się dokumentację dotyczącą przebiegu badania, kwalifikacji pracowników i sprawozdań z badań? Kto ją przechowuje? Przez jaki okres?			
7.6. Czy sprawozdanie z badania obejmuje: Gatunek zwierząt • Kod próbki			
• Zastosowaną metodę badań			
• Ilość wytrawionej tkanki mięśniowej w zależności od gatunku zwierzęcia			
• Masę niestrawionego mięsa pozostałego na sitku			
• Wyniki badania			
• Imię i nazwisko analityka wykonującego badanie			
• Datę i godzinę wykonania badania			
• Podpis analityka			
• Podpis osoby nadzorującej			
• Komentarz / uwagi			
7.7. Czy w przypadku wyników dodatnich dokument systemowy (procedura) obejmuje:			
• Identyfikację próbek z wynikami dodatnimi			
• Pełną identyfikowalność próbki o wyniku dodatnim z tuszą			
• Gromadzenie i konserwowanie larw w 90% alkoholu etylowym oraz sprawdzanie rzeczywistej obecności larw w fiolce			
• Przekazanie fiolki zawierającej larwy do Krajowego Laboratorium Referencyjnego lub Laboratorium Referencyjnego UE ds. pasożytów w celu identyfikacji gatunków			
7.7.1. Czy laboratorium stosuje wytyczne Międzynarodowej Komisji Włośnicowej lub Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt dotyczące postępowania z próbkami o wynikach dodatnich oraz zarządzania wynikami?			
8. Metody badań: krytyczne punkty kontroli			
8.1. Urządzenia			
8.1.1. Czy ostrze tnące w mikserach jest regularnie sprawdzane lub wymieniane?			
8.1.2. Czy sito jest zrobione z mosiądzu lub stali nierdzewnej i czy rozmiar oczek sita			

wynosi 180 - 200µm? 8.1.3. Czy jest ono regularnie i odpowiednio czyszczone?			
8.1.4. Czy stereomikroskop optyczny z zespołem lusterkowym i źródłem światła o regulowanej intensywności jest sprawny i umożliwia identyfikację larw włośni?			
8.2. ***Materiały eksploatacyjne***			
8.2.1. Czy dostępne są odpowiednie pipety do zbierania larw?			
8.2.2. Czy dostępne są małe fiolki stożkowe (1–2ml) do przechowywania larw?			
8.3. ***Odczynniki***			
8.3.1. Czy kwas chlorowodorowy ma odpowiednie stężenie molowe?			
8.3.2. Pepsyna: • Czy ma odpowiednią aktywność?			
• Czy jest odpowiednio przechowywana?			
• Czy termin ważności jest wyraźnie podany?			
8.3.3. Czy do konserwacji larw stosowany jest 90% alkohol etylowy?			
8.4. ***Przygotowanie płynu wytrawiającego***			
8.4.1. Czy przestrzega się kolejności dodawania składników płynu wytrawiającego? 1. woda, 2. kwas chlorowodorowy i 3. pepsyna			
8.5. ***Gromadzenie osadu pierwotnego i wtórnego***			
8.5.1. Czy czas sedymentacji jest odpowiedni?			
8.5.2. Czy analityk jest w stanie ocenić, że płyn wytrawiający nie jest wystarczająco klarowny, aby przeprowadzić jego badanie, i zarządzić doczyszczanie próbki?			
8.6. ***Badanie mikroskopowe***			
8.6.1. Czy analitycy zostali przeszkoleni w zakresie: • rozpoznawania larw w rynience do liczenia larw lub na płytce Petriego?			
• natychmiastowego zbierania larw i konserwowania ich w fiolce stożkowej w 90% alkoholu etylowym?			
8.7. ***Zapewnienie ważności wyników badania:***			
8.7.1. Czy laboratorium posiada dokument systemu zarządzania obejmujący wewnętrzną kontrolę jakości materiałów oraz punktów krytycznych badań?			
9. Szkolenie personelu			

9.1 Czy pracownicy zajmujący się badaniem próbek zostali przeszkoleni poprzez udział w: • programie kontroli jakości badań stosowanych do wykrywania larw włośni?			
• regularnej ocenie procedur badania, rejestrowania i analizy stosowanych w laboratorium?			
10. Badanie biegłości			
10.1. Czy analitycy wykonujący badania regularnie uczestniczą w badaniach biegłości organizowanych przez Krajowe Laboratorium Referencyjne?			
10.2. Czy w przypadku uzyskania wyniku niezadowalającego analizuje przyczyny niepowodzenia?			
10.3 Czy wdraża odpowiednie działania naprawcze?			
10.4 Czy powtarza badanie przy użyciu dodatkowych próbek przekazanych przez krajowe laboratorium referencyjne lub unijne laboratorium referencyjne?			

18. Literatura:

1. EC No 2015/1375, *COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2015/1375 of 10 August 2015 laying down specific rules on official controls for Trichinella in meat* https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32015R1375&from=EN in *Official Journal of the European Union*
2. Rossi, P., K. de Smet, and E. Pozio, *Detection of Trichinella Larvae in Meat: Comparison of ISO 18743:2015 with Regulation (EU) 2015/1375.* Food Analytical Methods, 2017. **10**(3): p. 634-639.
3. Mayer-Scholl, A., et al., *Magnetic Stirrer Method for the Detection of Trichinella Larvae in Muscle Samples.* Jove-Journal of Visualized Experiments, 2017(121).
4. Chmurzynska, E., et al., *Trichinella nativa in red foxes (Vulpes vulpes) of Germany and Poland: Possible different origins.* Veterinary Parasitology, 2013. **198**(1-2): p. 254-257.
5. Bilska-Zajac, E., et al., *Trichinella species circulating in wild boar (Sus scrofa) populations in Poland.* Int J Parasitol Parasites Wildl, 2013. **2**: p. 211-3.
6. Rozycki, M., et al., *First case of Trichinella spiralis infection in beavers (Castor fiber) in Poland and Europe.* International Journal for Parasitology-Parasites and Wildlife, 2020. **11**: p. 46-49.
7. Gamble, H.R., et al., *International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of Trichinella in domestic and wild animals intended for human consumption.* Veterinary Parasitology, 2000. **93**(3-4): p. 393-408.
8. Nockler, K., et al., *Detection of Trichinella infection in food animals.* Veterinary Parasitology, 2000. **93**(3-4): p. 335-350.
9. Pozio, E., *Searching for Trichinella: not all pigs are created equal.* Trends in Parasitology, 2014. **30**(1): p. 4-11.
10. Pozio, E. and P. Rossi, *Guidelines for the identification and development of sampling methods and design of suitable protocols for monitoring of Trichinella infection in indicator species.* Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita, 2008. **44**(2): p. 200-204.
11. Forbes, L.B. and A.A. Gajadhar, *A validated Trichinella digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat.* Journal of Food Protection, 1999. **62**(11): p. 1308-1313.
12. Nockler, K., et al., *Comparison of three artificial digestion methods for detection of non-encapsulated Trichinella pseudospiralis larvae in pork.* Veterinary Parasitology, 2009. **159**(3-4): p. 341-344.
13. Maddox-Hyttel, C., et al., *Evaluation of a fluid versus a powder pepsin formulation to detect Trichinella spiralis larvae in meat samples by a digestion technique.* Journal of Food Protection, 2007. **70**(12): p. 2896-2899.
14. La Rosa, G., et al., *Molecular identification of natural hybrids between Trichinella nativa and Trichinella T6 provides evidence of gene flow and ongoing genetic divergence.* International Journal for Parasitology, 2003. **33**(2): p. 209-216.
15. Franssen, F., et al., *Genetic evidence of interspecies introgression of mitochondrial genomes between Trichinella spiralis and Trichinella britovi under natural conditions.* Infection Genetics and Evolution, 2015. **36**: p. 323-332.
16. *OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccines - Third Edition, 1996.* Journal of Equine Veterinary Science, 1997. **17**(3): p. 130-130.
17. Alban, L., et al., *Towards a standardised surveillance for Trichinella in the European Union.* Preventive Veterinary Medicine, 2011. **99**(2-4): p. 148-160.

18. Rossi, P. and E. Pozio, *Guidelines for the detection of Trichinella larvae at the slaughterhouse in a quality assurance system.* Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita, 2008. **44**(2): p. 195-199.
19. Forbes, L.B., A. Rajic, and A.A. Gajadhar, *Proficiency samples for quality assurance in Trichinella digestion tests.* Journal of Food Protection, 1998. **61**(10): p. 1396-1399.
20. Chmurzynska, E., et al., *Results of proficiency testing (PT) for Trichinella in 2014.* Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice, 2016. **72**(5): p. 312-316.