

31984L0319

L 167/34

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

27.6.1984

## SMĚRNICE KOMISE

ze dne 7. června 1984,

**kteřou se mění přílohy směrnice Rady 77/96/EHS o vyšetření čerstvého masa domácích prasat na trichinely (*trichinella spiralis*) při jeho dovozu ze třetích zemí**

(84/319/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 77/96/EHS o vyšetření čerstvého masa domácích prasat na trichinely (*trichinella spiralis*) při jeho dovozu ze třetích zemí<sup>(1)</sup> naposledy pozměněnou směrnicí 83/91/EHS<sup>(2)</sup>, a zejména na článek 8 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že nedávné studie umožnily vypracovat některé metody pro zjišťování výskytu trichinel ve vepřovém mase; že spolehlivost těchto metod z hlediska ochrany zdraví je rovnocenná spolehlivosti stávajících metod; že by se proto příloha I směrnice 77/96/EHS měla patřičně doplnit;

vzhledem k tomu, že pro usnadnění práce při vyšetřování na výskyt trichinel by se mělo třetím zemím a členským státům dovolit, aby si zvolily mezi vyšetřovacími metodami, které jsou k dispozici;

vzhledem k tomu, že musí být provedeny určité úpravy v současnosti používaných metod vyšetření na výskyt trichinel a pokud jde o podmínky, které laboratoře zapojené do zjišťování výskytu trichinel, musí splňovat;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého veterinárního výboru,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

## Článek 1

Směrnice 77/96/EHS se mění v souladu s přílohou.

## Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 1. ledna 1985. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

## Článek 3

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 7. června 1984.

Za Komisi

Poul DALSAGER

člen Komise

<sup>(1)</sup> Úř. věst. L 26, 31.1.1977, s. 67.<sup>(2)</sup> Úř. věst. L 59, 5.3.1983, s. 34.

## PŘÍLOHA

## A. Příloha I se mění takto.

## 1. V oddíle II písmenu a):

— desátá odrážka se nahrazuje tímto:

„— stereomikroskop (zvětšení 15 až 40x) s vhodným světelným zdrojem,“

— poslední odrážka se nahrazuje tímto:

„— trávící tekutina s tímto složením:

10 g pepsinu (80 µg FIP: Fédération internationale de pharmacie) a 5 ml HCl (nejméně 37 %) doplnit pitnou vodou z vodovodu do jednoho litru.“

## 2. Oddíl III se nahrazuje tímto:

## „III. METODA POUŽÍVAJÍCÍ UMĚLÉ TRÁVENÍ SMĚSNÝCH VZORKŮ

a) **Přístrojové vybavení a chemikálie**

— nůž a pinzeta pro odběr vzorků,

— mlýnek na maso s čelní deskou s otvory o průměru 2 až 3 mm,

— Erlenmeyerova baňka o objemu 3 litry s pryžovou nebo vatovou zátkou,

— kuželová dělicí nálevka o objemu 2 000 ml,

— obyčejný stojan s podstavcem tvaru A o délce asi 28 cm a tyčí délky 80 cm,

— kruh na nálevku o průměru 10 až 11 cm, který lze upevnit na stojan,

— svorka s plochými čelistmi (23 x 40 mm), kterou lze upevnit na stojan dvojitou spojkou,

— sítko (s velikostí oka 177 mikrometrů) o vnějším průměru 11 cm, opatřené sítím z mosazi nebo korozivzdorné oceli,

— nálevka s vnitřním průměrem nejméně 12 cm,

— skleněné odměrné válce 100 ml,

— stereomikroskop (zvětšení 15 až 40x) s vhodným světelným zdrojem nebo trichinoskop s horizontálním stolkem pro kompresor s vhodným světelným zdrojem,

— při používání trichinoskopu: používá se vanička na počítání larev, kterou lze popsat takto:

vanička na počítání larev je vyroben z akrylátových desek o tloušťce 3 mm takto:

i) dno vaničky má mít rozměry 180 x 40 mm a jsou na něm vyznačeny čtverce;

ii) boky mají být 230 x 20 mm;

iii) čela mají mít rozměry 40 x 20 mm. Dno a čela je třeba vsunout mezi boky tak, že se získá vanička s dvěma krátkými držadly na obou čelech. Horní stranu dna je třeba zvednout o 7 až 9 mm nad základnu rámu, tvořeného boky a čely. Díly je třeba upevnit pro materiál vhodným lepidlem,

— několik Petriho misek o průměru 9 cm (používá-li se stereomikroskop), rozdělených na spodní straně na vyšetřovací čtvercové plošky 10 x 10 mm pomocí zahroceného nástroje,

— několik desetilitrových nádob použitelných pro dekontaminaci zařízení, jako je ošetření formolem, a pro zbývající natrávenou šťávu v případě pozitivních výsledků,

— koncentrovaná kyselina chlorovodíková (37 %),

— pepsin o koncentraci: 1: 10 000 NF (US National Formulary)

odpovídající 1: 12 500 BP (British Pharmacopoeia)

odpovídající 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie),

— několik misek, do kterých vejde asi 50 vzorků asi po 2 g,

— váhy vážící s přesností na 0,1 g.

**b) Odběr vzorků**

1. V případě celých jatečně opracovaných trupů je nutno vzorek o hmotnosti přibližně 2 g odebrat od šlašitého středu bránice (bráničního pilíře) u přechodu do šlašité části. Pokud brániční pilíře chybí, je třeba vzorek stejné velikosti odebrat z žeberní části bránice u hrudní kosti, ze svalu jazyka nebo žvýkacího svalu, nebo z břišního svalstva.
2. Z porcovaného masa je nutné odebrat přibližně dvougramový vzorek kosterního svalstva s malým obsahem tuku, kde to je možné, v blízkosti kostí či šlach.

**c) Metoda**

1. i) *Kompletní skupiny* (100 vzorků najednou)

Z každého ze 100 individuálních vzorků z prasat se odebere přibližně jednogramový vzorek. Sjedenocný vzorek se společně semele v mlýnku na maso.

Mleté maso se vnese do třílitrové Erlenmeyerovy baňky společně se 7 g pepsinu, přibližně 2 litry vodovodní vody zahřáté asi na 40 až 41 °C a 25 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Směs se protřepe, aby se rozpustil pepsin.

Hodnota pH roztoku bude přibližně 1,5 až 2.

— Pro trávení musí být Erlenmeyerova baňka udržována asi čtyři hodiny na konstantní teplotě 40-41 °C. Obsah baňky je během této doby třeba pravidelně protřepávat, nejméně dvakrát každou hodinu.

— Natrávený roztok (výluh) se přefiltruje přes sítko do dvoulitrové kuželové dělicí nálevky a ponechá se v klidu dělit nejméně 1 hodinu.

— Celkový objem asi 45 ml se vypustí do odměrného válce a rozdělí mezi tři Petriho misky (jejichž dna je třeba rozdělit vyznačením na čtverečky), aby v každé misce bylo 15 ml.

— Každá Petriho miska se podrobně prohlédne na larvy trichinel pod stereomikroskopem.

— Používají-li se vaničky pro počítání larev, uvedených 45 ml se rozdělí mezi dvě počítací vaničky a prozkoumá se pod trichinoskopem.

Larvy se jeví jako identifikovatelné organismy v usazenině a často, je-li voda vlažná, lze pozorovat jejich svinování do spirály a rozvinování.

— Natrávené roztoky (výluhy) je třeba vyšetřit okamžitě, jakmile jsou k dispozici. Vyšetření nesmí být za žádných okolností odloženo na následující den.

Jsou-li výluhy zakalené nebo nejsou-li vyšetřeny do 30 minut po přípravě, je třeba je vyčistit takto: konečný vzorek 45 ml se nalije do odměrného válce a ponechá 10 minut stát. Na konci této doby se odsátím odebere 30 ml tekutiny nad sedimentem a zbylých 15 ml se doplní na 45 ml vodovodní vodou. Po dalším desetiminutovém stání se znovu odsaje horních 30 ml a zbylých 15 ml se převede do Petriho misky nebo počítací vaničky k vyšetření. Odměrný válec je třeba vymýt 10 ml vodovodní vody a tato prací voda se přidá k vzorku v Petriho misce nebo vaničce pro počítání larev k vyšetření.

- ii) *Skupiny s méně než 100 vzorky*

K celkové skupině 100 vzorků lze přidat až 15 jednotlivých vzorků a vyšetřovat je společně. Jestliže se vyšetřuje více než 15 a méně než 100 vzorků, je třeba v příslušném poměru zmenšit objem natrávené tekutiny (výluhu).

2. V případě pozitivních nebo dubiálních výsledků po vyšetření směšného vzorku je třeba odebrat další 20 gramový vzorek z každého prasete podle písmene b) výše. Tyto dvacetigramové vzorky (vždy) z pěti prasat je třeba spojit a vyšetřit shora uvedeným způsobem. Tak se vyšetří vzorky z 20 skupin po pěti prasatech. Jestliže se ve společném vzorku z pěti prasat zjistí trichinely, je třeba z každého z těchto pěti prasat odebrat další 20 gramový vzorek a každý z nich vyšetřit odděleně shora popsaným způsobem.“
3. Doplňují se nové oddíly IV, V a VI, které znějí:

„IV. METODA TRÁVENÍ SMĚSNÉHO VZORKU POMOCÍ MECHANICKÉHO ZAŘÍZENÍ  
A SEDIMENTAČNÍ TECHNIKY

a) **Přístrojové vybavení a chemikálie**

- nůž a nebo nůžky pro odběr vzorků,
- misky s vyznačením 50 čtverečků, z nichž každý může pojmout vzorky asi 2 gramů masa,
- laboratorní míchačka (homogenizátor) Stomacher, model 3 500 Thermo,
- plastové vaky vhodné pro míchačku Stomacher,
- kuželové dělicí nálevky o objemu 2000 ml, s výhodou opatřené teflonovými bezpečnostními zátkami,
- stojany, kruhy a svorky,
- sítko (s velikostí oka 177 mikrometrů) o vnějším průměru 11 cm, opatřené sítím korozivzdorné oceli,
- nálevky s vnitřním průměrem nejméně 12 cm pro podporu sítěk,
- skleněné odměrné válce 100 ml,
- dávkovač o obsahu 25 ml,
- kádinky o objemu 3 litry,
- lžíce nebo míchací tyčinka pro míchání natrávené tekutiny v kádince,
- plastová injekční stříkačka s hadičkou na odsávání,
- lžičková odměrka na 6 gramů,
- teploměr s přesností měření  $\pm 0,5$  °C v rozmezí 0 °C až 100 °C,
- vibrátor, např. elektrický holící strojek se sejmoutou hlavou,
- časové spínací relé spínající v minutových intervalech,
- trichinoskop s horizontálním stolkem nebo stereomikroskop s vhodným světelným zdrojem,
- při používání trichinoskopu: používá se vanička na počítání larev; vanička na počítání larev je vyrobena z akrylátových desek o tloušťce 3 mm takto:
  - i) dno vaničky má mít rozměry 180 × 40 mm a jsou na něm vyznačeny čtverce;
  - ii) boky mají být 230 × 20 mm;
  - iii) čela mají mít rozměry 40 × 20 mm. Dno a čela je třeba vsunout mezi boky tak, že se získá vanička s dvěma krátkými držadly na obou čelech. Horní stranu dna je třeba zvednout o 7 až 9 mm nad základnu rámu, tvořeného boky a čely. Díly je třeba upevnit pro materiál vhodným lepidlem,
- několik Petriho misek o průměru 9 cm (používá-li se stereomikroskop), rozdělených na spodní straně na vyšetřovací čtvercové plošky 10 × 10 mm pomocí zahroceného nástroje,
- 17,5 % roztok kyseliny chlorovodíkové,
- pepsin o koncentraci 1: 10 000 NF (US National Formulary)  
odpovídající 1: 12 500 BP (British Pharmacopoeia)  
odpovídající 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie),
- několik desetilitrových nádob použitelných pro dekontaminaci zařízení, jako je ošetření formolem, a pro zbývající natrávenou šťávu v případě pozitivních výsledků,
- váhy vážící s přesností na 0,1 g.

**b) Odběr vzorků**

1. V případě celých jatečně opracovaných trupů je nutno vzorek o hmotnosti přibližně 2 g odebrat od bráničního pilře u přechodu do šlašité části. Pokud brániční pilře chybí, je třeba vzorek stejné velikosti odebrat z žeberní části bránice u hrudní kosti, ze svalu jazyka nebo žvýkačického svalu nebo břišního svalstva.
2. Z porcovaného masa je nutné odebrat přibližně dvougramový vzorek kosterního svalstva s malým obsahem tuku, kde to je možné, v blízkosti kostí či šlach.

**c) Metoda****1. Postup trávení****i) Kompletní skupiny (100 vzorků najednou)**

- Laboratorní míchačku Stomacher 3 500 je třeba vybavit dvojitým plastovým vakem a regulaci teploty nastavit na 40 až 41 °C.
- Do vnitřního plastového vaku se nalije jeden a půl litru vody, předeřtá se na 32 až 35 °C a voda se zahřeje na 40 až 41 °C.
- K vodě v míchačce se přidá 25 ml 17,5 % kyseliny chlorovodíkové.
- Potom se přidá 100 vzorků po (přibližně) 1 gramu (za teploty 25 až 30 °C), odebraných podle písmene b) výše z každého z individuálních vzorků.
- Nakonec se přidá 6 g pepsinu. Toto pořadí přidávání je třeba přísně dodržet, aby se předešlo rozkladu pepsinu.
- Obsah vaku se nechá v míchačce Stomacher rozmělnovat 25 minut.
- Plastový vak se pak z přístroje vyjme a natrávená tekutina se přefiltruje přes sítko do třilitrové kádinky.
- Plastový vak se vymyje asi 100 ml vody, která se pak použije pro promytí sítko a nakonec se přidá k filtrátu do kádinky.

K celkové skupině 100 vzorků lze připojit až 15 jednotlivých vzorků a vyšetřit je společně s těmito vzorky.

**ii) Menší skupiny než 100 vzorků**

- Laboratorní míchačku Stomacher 3 500 je třeba vybavit dvojitým plastovým vakem a regulaci teploty nastavit na 40 až 41 °C.
- Trávící tekutina se připraví smíšením asi jednoho a půl litru vody a 25 ml 17,5 % kyseliny chlorovodíkové. Přidá se 6 g pepsinu a celá směs se promíchá při teplotě 40 – 41 °C. Toto pořadí přidávání je třeba přísně dodržet, aby se předešlo rozkladu pepsinu.
- Z trávící tekutiny se odměří objem odpovídající 15 ml na gram vzorku (např. na 30 vzorků je potřebných 30 x 15 ml, neboli 450 ml) a přenesse se do vnitřního z obou plastových vaků společně se vzorky masa velikosti asi 1 g (při 25 až 30 °C), odebranými z každého z individuálních vzorků podle odstavce b) shora.
- Do vnějšího vaku se přidá voda o teplotě asi 41 °C tak, aby celkový objem v obou vacích činil jedena půl litru.
- Obsah vaku se potom nechá v míchačce Stomacher rozmělnovat 25 minut.
- Plastový vak se pak z přístroje vyjme a natrávená tekutina se přefiltruje přes sítko do třilitrové kádinky.
- Plastový vak se vymyje asi 100 ml vody, která se pak použije pro promytí sítko a nakonec se přidá k filtrátu do kádinky.

**2. Získání larev sedimentací**

- K natrávené tekutině se přidá led (300 až 400 g ledu ve formě vloček, šupin nebo drti) tak, že se její objem doplní asi na 2 litry. Směs se míchá tak dlouho, dokud led neroztaje.  
V případě menších skupin (vzorků, viz odst. 1 bod ii)), je třeba množství ledu příslušně snížit.
- Vychlazená natrávená tekutina se převede do dvoulitrové dělicí nálevky, opatřené vibrátorem, uchyceným ve vnější sorce.

- Směs se ponechá 30 minut sedimentovat, přičemž se na dělicí nálevku působí přerušovaně vibrátorem (každou druhou minutu na dobu jedné minuty).
- Po 30 minutách se rychle odpustí 60 ml vzorek sedimentu do odměrného válce o objemu 100 ml. (Po použití se nálevka vypláchne detergentem.)
- Tento 60 ml vzorek se ponechá nejméně 10 minut odstát. Po této době je třeba odsát tekutinu nad sedimentem a ponechat objem asi 15 ml, který se vyšetří na přítomnost larev.
- Pro odsátí se použije injekční stříkačka na jedno použití, opatřena plastovou trubičkou.  
Je třeba, aby trubička měla takovou délku, že v odměrném válci zůstane 15 ml tekutiny, když se příruba injekční stříkačky opře o okraj válce.
- Zbývajících 15 ml se přelije do vaničky na počítání larev nebo dvou Petriho misek a vyšetří pod trichinoskopem nebo, v druhém případě, pod stereomikroskopem.
- Výsledné tekutiny (výluhy) je třeba vyšetřit okamžitě, jakmile jsou připravené. Vyšetření nesmí být za žádných okolností odložena na druhý den.

Jsou-li výluhy zakalené nebo nejsou-li vyšetřeny do 30 minut po přípravě, je třeba je vyčistit takto: konečný vzorek 45 ml se nalije do odměrného válce a ponechá 10 minut stát. Na konci této doby se odsátím odebere 30 ml tekutiny nad sedimentem a zbylých 15 ml se doplní na 45 ml vodovodní vodou. Po dalším desetiminutovém stání se znovu odsaje horních 30 ml a zbylých 15 ml se převede do Petriho misky nebo počítací vaničky k vyšetření. Odměrný válec je třeba vymýt 10 ml vodovodní vody a tato prací voda se přidá k vzorku v Petriho misce nebo vaničce pro počítání larev k vyšetření.

3. V případě pozitivních nebo dubiálních výsledků po vyšetření směsného vzorku je třeba odebrat další 20 gramový vzorek z každého prasete podle písmene b) výše. Tyto dvacetigramové vzorky (vždy) z pěti prasat je třeba spojit a vyšetřit shora uvedeným způsobem. Tak se vyšetří vzorky z 20 skupin po pěti prasatech. Jestliže se ve společném vzorku z pěti prasat zjistí výskyt trichinel, je třeba z každého z těchto pěti prasat odebrat další 20 gramový vzorek a každý z nich vyšetřit odděleně shora popsáním způsobem.

#### V. METODA TRÁVENÍ SMĚSNÉHO VZORKU POMOCÍ MECHANICKÉHO ZAŘÍZENÍ A TECHNIKY 'IZOLACE NA FILTRU'

##### a) **Přístrojové vybavení a chemikálie**

Vybavení a chemikálie uvedené u metody IV písmene a).

Shora uvedené vybavení je třeba doplnit tímto:

- Gelmanovou nálevkou o objemu 1 l, doplněná držákem filtru (o průměru 45 mm),
- filtračním kotoučky; tyto filtrační kotoučky se skládají z:
  - kruhového sítka z korozivzdorné oceli o průměru 45 mm a s. velikostí otvorů 35 mikrometrů,
  - dvou pryžových kroužků z 1 mm tlusté pryže (o vnějším průměru 45 mm a vnitřním průměru 35 mm),
 kruhové sítko se vloží mezi oba pryžové kroužky a vlepí se mezi ně dvousložkovým lepidlem, slučitelným s oběma materiály;
- odsávací Erlenmeyerovou baňkou o objemu 3 litry s postranní trubicí na odsávání,
- filtrační vývěvou,
- plastovými váčky o objemu nejméně 80 ml,
- zařízením na zatavování plastových sáčků,
- renilázou o koncentraci 1:150 000 Soxhletových jednotek na gram.

##### b) **Odběr vzorků**

Viz metodu IV písmeno b).

c) **Metoda**1. *Postup trávení*i) **Kompletní skupiny** (100 vzorků najednou)

Viz metodu IV písmeno c) odst. 1 bod i).

ii) **Menší skupiny než 100 vzorků**

Viz metodu IV c) odst. 1 bod ii).

2. *Získání larev filtrací*

— K natrávené tekutině se přidá led (300 až 400 g ledu ve formě vloček, šupin nebo drti) tak, že se její objem doplní asi na 2 litry.

V případě menších skupin (vzorků) je třeba množství ledu příslušně snížit.

— Směs se míchá tak dlouho, dokud led neroztaje. Vychlazená natrávená tekutina se pak ponechá nejméně tři minuty v klidu, aby se larvy svinuly.

— Na odsávací baňku připojenou na vývěvu se připojí Gelmanova nálevka s držákem filtru a filtračním kotoučkem.

— Natrávená tekutina se pak nalije do Gelmanovy nálevky a přefiltruje. Ke konci filtrace lze průchod natrávené tekutiny filtrem urychlit pomocí odsávání vývěvou. Jakmile je filtr téměř suchý, tj. když v nálevce zbývá jen asi 2 až 5 ml tekutiny, je třeba odsávání ukončit.

— Po přefiltrování veškeré natrávené tekutiny se vyjme filtrační kotouček a vloží se do plastového váčku o objemu 80 ml spolu s 15 až 20 ml roztoku renilázy. Tento roztok renilázy se získá přidáním 2 g renilázy do 100 ml vodovodní vody.

— Plastový váček se dvakrát zataví a vloží do míchačky Stomacher mezi vnější a vnitřní vak.

— Obsah se ve Stomacheru nechá rozmělnit po dobu tří minut, bez ohledu na to, zda se zpracovává kompletní nebo nekompletní skupina.

— Po třech minutách se plastový váček s filtračním kotoučkem a roztokem renilázy vyjme ze Stomacheru a otevře nůžkami. Kapalný obsah se nalije do vaničky na počítání larev nebo na Petriho misku. Váček se vymyje 5 až 10 ml vody, která se pak přidá do vaničky pro vyšetření trichinoskopem nebo do Petriho misky pro vyšetření pod stereomikroskopem.

— Výsledné tekutiny (výluhy) je třeba vyšetřit okamžitě, jakmile jsou připravené. Vyšetření nesmí být za žádných okolností odloženo na druhý den.

*Poznámka:*

Filtrační kotoučky se nemají nikdy použít, nejsou-li dokonale čisté. Nečisté kotoučky se nikdy nemají nechat vyschnout.

Filtrační kotoučky lze vyčistit ponecháním v roztoku renilázy přes noc. Před použitím je třeba je vyprat v čerstvém roztoku renilázy pomocí Stomacheru.

## 3. V případě pozitivních nebo dubiálních výsledků po vyšetření směsného vzorku je třeba odebrat další 20 gramový vzorek z každého prasete podle písmene b) výše. Tyto dvacetigramové vzorky (vždy) z pěti prasat je třeba spojit a vyšetřit shora uvedeným způsobem. Tak se vyšetří vzorky z 20 skupin po pěti prasatech. Jestliže se ve společném vzorku z pěti prasat zjistí výskyt trichinel, je třeba z každého z těchto pěti prasat odebrat další 20 gramový vzorek a každý z nich vyšetřit odděleně shora popsáním způsobem.

## VI. METODA S MAGNETICKÝM MÍCHADLEM PRO TRÁVENÍ SMĚSNÝCH VZORKŮ

a) **Přístrojové vybavení a chemikálie**

— nůž a pinzeta pro odříznutí vzorků,

— misky s vyznačením 50 čtverečků, z nichž každý může pojmout vzorky asi 2 gramů masa,

— míchačka (mixér) Moulinette,

— magnetické míchačky s termostatem regulovanou topnou ploténkou a teflonem povlečenými míchacími tyčinkami o délce asi 5 cm,

- kuželové dělicí nálevky o objemu 2 litry,
- stojany, kruhy a svorky,
- sítko s velikostí oka 177 mikrometrů o vnějším průměru 11 cm, opatřená sítím z korozivzdorné oceli,
- nálevky s vnitřním průměrem nejméně 12 cm pro uložení síték,
- kádinka o objemu 3 litry,
- skleněné odměrné válce o objemu přibližně 50 ml nebo kyvety do odstředivky,
- trichinoskop s horizontálním stolkem nebo stereomikroskop s vhodným světelným zdrojem,
- vanička na počítání larev (při používání trichinoskopu): vanička na počítání larev je vyrobena z akrylátových desek o tloušťce 3 mm takto:
  - i) dno vaničky má mít rozměry 180 × 40 mm a jsou na něm vyznačeny čtverce;
  - ii) boky mají být 230 × 20 mm;
  - iii) čela mají mít rozměry 40 × 20 mm. Dno a čela je třeba vsunout mezi boky tak, že se získá vanička s dvěma krátkými držadly na obou čelech. Horní stranu dna je třeba zvednout o 7 až 9 mm nad základnu rámu, tvořeného boky a čely. Díly je třeba upevnit pro materiál vhodným lepidlem,
- několik Petriho misek o průměru 9 cm (používá-li se stereomikroskop), rozdělených na spodní straně na vyšetřovací čtvercové plošky 10 × 10 mm pomocí zahroceného nástroje,
- hliníková folie,
- 25 % kyselina chlorovodíková,
- pepsin o koncentraci: 1: 10 000 NF (US National Formulary)  
odpovídající 1: 12 500 BP (British Pharmacopoeia)  
odpovídající 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie),
- vodovodní voda zahřátá na 46 až 48 °C,
- několik desetilitrových nádob použitelných pro dekontaminaci zařízení, jako je ošetření formolem, a pro zbývající natrávenou šťávu v případě pozitivních výsledků,
- váhy vážící s přesností na 0,1 g.

#### b) Odběr vzorků

1. V případě celých jatečně opracovaných trupů je nutno vzorek o hmotnosti přibližně 2 g odebrat od šlašitého středu bránice (bráničního pilíře) u přechodu do šlašité části. Pokud brániční pilíře chybí, je třeba vzorek stejné velikosti odebrat z žeberní části bránice u hrudní kosti, ze svalu jazyka nebo žvýkacího svalu nebo břišního svalstva.
2. Z porcovaného masa je nutné odebrat přibližně dvougramový vzorek kosterního svalstva s malým obsahem tuku, kde to je možné, v blízkosti kostí či šlach.

#### c) Metoda

1. i) *Kompletní skupiny* (100 vzorků najednou)
  - 100 vzorků, každý přibližně velikosti 1 g, odebraných z každého z individuálních vzorků podle odst. b), se naseká v míchačce (mixéru) Moulinette. Míchačka se spouští tři až čtyřikrát, pokaždé asi na jednu sekundu.
  - Nasekané maso se vnese do 3 litrové kádinky a postříká se 10 g pepsinu. Přibližně 2 litry vodovodní vody zahřáté asi na 40 až 41 °C se spolu 16 ml nalije do kádinky.
  - Sekací hlava míchačky Moulinette se opakovaně ponoří do trávené tekutiny v kádince, aby se odstranilo všechno na ní dosud ulpělé maso.
  - Do kádinky se vhodí magnetická míchací tyčinka a kádinka se zakryje hliníkovou folií.



- Kádinka se uloží na předeřátou ploténku magnetické míchačky a zahájí se míchání. Před zahájením míchání je třeba míchačku nastavit tak, aby po celou dobu provozu udržovala konstantní teplotu 44 až 46 °C. Během míchání se má natrávená tekutina otáčet v dostatečně vysokých otáčkách, aby vytvářela hluboký vír, ale nestříkala ven.
- Natrávená tekutina se míchá 30 minut. Na konci se míchání vypne, a natrávená tekutina se přelije přes sítko do sedimentační nálevky.
- Výluh se ponechá v klidu v nálevce 30 minut.
- Po 30 minutách se rychle odpustí 40 ml vzorek výluhu do odměrného válce nebo odstředivkové kyvety.
- Tento 40 ml vzorek se nechá 10 minut odstát a potom se odsaje 30 ml tekutiny nad sedimentem, takže zbude objem 10 ml.
- Zbývající vzorek 10 ml usazeniny se přelije do vaničky na počítání larev nebo do Petriho misky.
- Potom se válec nebo odstředivková zkumavka vypláchnou asi 10 ml vodovodní vody, která pak musí být přidána ke vzorku ve vaničce na počítání larev nebo v Petriho misce.
- Natrávené roztoky (výluhy) je třeba vyšetřit okamžitě, jakmile jsou k dispozici. Vyšetření nesmí být za žádných okolností odloženo na následující den.

Nejsou-li výluhy vyšetřeny do 30 minut po přípravě, je třeba je vyčistit takto: konečný vzorek asi 40 ml se nalije do odměrného válce a ponechá 10 minut stát. Na konci této doby se odsátím odebere 30 ml tekutiny nad sedimentem a zbylých 10 ml se doplní na 40 ml vodovodní vodou. Po dalším desetiminutovém stání se znovu odsaje horních 30 ml a zbylých 10 ml se převede do Petriho misky nebo počítací vaničky k vyšetření. Odměrný válec je třeba vymýt 10 ml vodovodní vody a tato prací voda se přidá k vzorku v Petriho misce nebo vaničce pro počítání larev k vyšetření.

Jestliže se ukáže, že je sediment při vyšetření zakalený, je třeba vzorek nalít do odměrného válce a doplnit na 40 ml vodovodní vodou a zopakovat shora uvedený postup.

ii) *Skupiny s méně než 100 vzorky*

K celkové skupině 100 vzorků lze přidat až 15 jednotlivých vzorků a vyšetřovat je společně podle písm. c) odst. 1 bod i). Jestliže se vyšetřuje více než 15, je třeba je vyšetřovat jako kompletní skupinu. Pro skupiny do 50 vzorků lze objem natrávené tekutiny snížit na 1 litr.

2. V případě pozitivních nebo dubiálních výsledků po vyšetření směsného vzorku je třeba odebrat další 20 gramový vzorek z každého prasete podle písmene b) výše. Tyto dvacetigramové vzorky (vždy) z pěti prasat je třeba spojit a vyšetřit shora uvedeným způsobem. Tak se vyšetří vzorky z 20 skupin po pěti prasatech. Jestliže se ve společném vzorku z pěti prasat zjistí trichinely, je třeba z každého z těchto pěti prasat odebrat další 20 gramový vzorek a každý z nich vyšetřit odděleně shora popsáním způsobem.“

B. V příloze II kapitole I se odstavec 1 mění takto:

1. Písmeno b) se nahrazuje tímto:

„b) patřičně vybavenou uzamykatelnou místností, kterou lze zatemnit, když se provádí vyšetření trichinoskopem;“

2. Písmeno f) se zrušuje; dosavadní písmena g), h), i), j), k), l), m) a n) se označují jako f), g), h), i), j), k), l) a m).

3. Nové písmeno g) se nahrazuje tímto:

„g) umývárnu pro očistu a desinfekci vyšetřovacího vybavení (např. zásobníků na vzorky, kompresorů, nožů a nůžek) s:

- vodovzdornou podlahovinou, která je odolná proti hnilobě a snadno se čistí a desinfikuje,
- hladkými stěnami, které jsou nejméně do výšky 2 m opatřeny omyvatelným obkladem nebo nátěrem světlé barvy.

Toto ustanovení se nemusí použít, používají-li se metody uvedené pod body II, III, IV, V a VI přílohy I za předpokladu, že laboratoře jsou vybaveny velkou vhodně instalovanou a připojenou výlevkou.“

---