

31984L0319

L 167/34

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

27.6.1984

## SMERNICA KOMISIE

zo 7. júna 1984,

**ktorou sa menia a dopĺňajú prílohy k smernici Rady 77/96/EHS o vyšetreniach na trichinely (*trichinella spiralis*) pri dovoze čerstvého mäsa z ošípaných z tretích krajín**

(84/319/EHS)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 77/96/EHS z 21. decembra 1976 o vyšetovaní na trichinely (*trichinella spiralis*) pri dovoze čerstvého mäsa ošípaných z tretích krajín <sup>(1)</sup>, naposledy zmenenú a doplnenú smernicou 83/91/EHS <sup>(2)</sup>, najmä na jej článok 8,

keďže nedávne prieskumy umožnili vypracovanie určitých metód na zisťovanie trichinel v bravčovom mäse; keďže spoľahlivosť týchto metód z hľadiska ochrany zdravia je ekvivalentná so spoľahlivosťou existujúcich metód; keďže by sa preto mali urobiť príslušné doplnenia k prílohe I k smernici 77/96/EHS;

keďže, aby sa uľahčila práca pri vyšetrení na trichinely, mali by nečlenské krajiny a členské štáty mať povolené vybrať si medzi ustanovenými vyšetrovacími metódami;

keďže sa musia urobiť určité technické úpravy súčasne používaných metód vyšetovania na trichinely, a pokiaľ ide o podmienky, ktoré musia spĺňať laboratória zapojené do zisťovania trichinel;

keďže opatrenia ustanovené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho veterinárneho výboru,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

## Článok 1

Smernica 77/96/EHS sa týmto mení a dopĺňa, tak ako je ustanovené v prílohe.

## Článok 2

Členské štáty uvedú do účinnosti zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou najneskôr do 1. januára 1985. Bezodkladne o tom upovedomia Komisiu.

## Článok 3

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 7. júna 1984

Za Komisiu

Poul DALSAGER

člen Komisie

<sup>(1)</sup> Ú. v. ES L 26, 31.1.1977, s. 67.<sup>(2)</sup> Ú. v. ES L 59, 5.3.1983, s. 34.

## PRÍLOHA

A. Príloha I sa týmto mení a dopĺňa takto:

1. V bode II a):

— desiatu zarážku sa nahrádza takto:

„— stereomikroskop (zväčšenie 15 až 40×) s vhodným svetelným zdrojom,“

— poslednú zarážku sa nahrádza takto:

„— tráviaca tekutina pripravená takto:

10 g pepsínu (80 u/g FIP: Fédération internationale de pharmacie), 5 ml HCl (najmenej 37 %) doplnená do jedného litra vodou z vodovodu.“

2. Bod III sa nahrádza takto:

„III. METÓDA POUŽÍVAJÚCA UMELE TRÁVENIE PRI HROMADNÝCH VZORKÁCH

a) **Prístroje a reagenty**

- nôž a pinzety na odber materiálu,
- mlynček na mäso s otvormi s priemerom 2 až 3 mm,
- 3-litrová Erlenmayerova banka s gumovou alebo vatovou zátkou,
- kuželový deliaci lievik s kapacitou 2 000 ml,
- obyčajný stojan so základňou v tvare A s dĺžkou približne 28 cm a s 80 cm tyčou,
- kruh s priemerom 10 až 11 cm, ktorý je možné pripevniť na stojan,
- držiak s plochými svorkami (23 x 40 mm), ktorý sa môže pripojiť k stojanu pomocou dvojitej spojovacej skrutky,
- sitko (veľkosť otvorov 177 mikrónov) s vonkajším priemerom 11 cm, so sieťkovitým dnom z mosadze alebo z nerez,
- lievik s vnútorným priemerom najmenej 12 cm,
- 100 ml sklenené odmerné valce,
- stereomikroskop (zväčšenie 15 až 40×) s vhodným svetelným zdrojom, alebo trichoskop s horizontálnou doskou pre kompresor s vhodným svetelným zdrojom,
- v prípade použitia trichinoskopu: sa použije miska na počítanie lariev, ktorú je možné opísať takto:
  - miska na počítanie lariev sa vyrobí z akrylových doštičiek o hrúbke 3 mm takto:
    - i) dno misky je 180 × 40 mm, vyznačené do štvorcov,
    - ii) bočné steny majú 230 × 20 mm,
    - iii) koniec má 40 × 20 mm. Dno a konce musia byť zasunuté medzi bočné steny, aby tak tvorili misku s dvomi malými rúčkami na obidvoch koncoch. Horná časť dna musí byť zvýšená 7 až 9 mm od základne podstavca vytvoreného stenami a koncami. Jednotlivé časti sa upevnia použitím lepidla vhodného pre tento materiál,
- niekoľko Petriho misiek s priemerom 9 cm (ak sa použije stereomikroskop) označených na spodnej časti do štvorcových vyšetrovacích plôšok 10 x 10 mm použitím špicatého nástroja,
- niekoľko 10 litrových kontajnerov používaných, ak sa používa dekontaminácia prístroja, ako je ošetrovanie formalínom, a na zvyškovú tráviacu tekutinu v prípade pozitívnych výsledkov,
- koncentrovaná (37 %) kyselina chlorovodíková,
- pepsín s koncentráciou: 1: 10 000 NF (Národný formulár Spojených štátov)
  - zodpovedajúci 1: 12 500 BP (Britský liekopis)
  - zodpovedajúci 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie),
- niekoľko podnosov, na ktoré je možné dať 50 vzoriek, pričom v každej sú približne 2 g,
- váhy s presnosťou 0,1 g.

**b) Odber vzoriek**

1. V prípade celých tiel sa odoberie približne 2-gramová vzorka z bráničného piliera na prechode do šľachovitej časti. Ak bráničné piliere chýbajú, odoberú sa vzorky rovnakej veľkosti z rebrovej časti alebo zo sternálnej časti bránice, z jazykového svalu, zo žuvacieho svalu, alebo z brušných svalov.
2. Pri kusoch mäsa sa odoberie približne 2 g vzorka z kostrového svalstva s obsahom malého množstva tuku, a ak je to možné, z blízkosti kostí alebo šliach.

**c) Metóda**

1. i) *Úplne zmiešané hromadné vzorky* (100 vzoriek súčasne)

Z každej zo 100 individuálnych vzoriek získaných od ošípaných sa odoberie približne 1 g vzorky. Nasadená vzorka sa raz pomelie na mäsovom mlynčeku.

Pomleté mäso sa vloží do 3-litrovej Erlenmeyerovej banky spolu so 7 g pepsínu, približne 2 litrami vody z vodovodu zohriatej na 40 až 41°C, a 25 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Zmes sa pretrepáva až do rozpustenia pepsínu.

Roztok má mať pH okolo 1,5 až 2.

— Pri trávení sa Erlenmeyerova banka inkubuje pri 40 až 41°C približne štyri hodiny. Banka sa počas inkubácie pravidelne pretrepáva, najmenej dvakrát za hodinu.

— Natrávený roztok sa prefiltruje cez sitko do kužeľovitého 2 litrového deliaceho lievika a nechá sa v pokoji odstáť v stojane približne jednu hodinu.

— Celkový objem približne 45 ml tekutiny sa vypustí do odmerného valca a potom sa rozdelí do troch Petriho misiek, na dne ktorých sú vyznačené štvorce, v každej miske má byť 15 ml tekutiny.

— Každá Petriho miska sa do jednej minúty vyšetrí na prítomnosť lariev trichinel pod stereomikroskopom.

— Ak sa použijú misky na počítanie lariev, uvedených 45 ml sa rozdelí do dvoch takýchto misiek, a vyšetrí sa pod trichinoskopom.

Larvy sa javia ako identifikovateľné organizmy v usadenine a často, ak je voda vlažná, možno sledovať zvinovacie a rozvinovacie pohyby „špirály“.

— Natrávené roztoky by sa mali vyšetriť, akonáhle sú pripravené. Za žiadnych okolností by sa vyšetrenie nemalo odložiť na nasledujúci deň.

Ak sú natrávené roztoky nezreteľné alebo nevyšetrené do 30 minút od ich prípravy, musia sa nasledovne vyčistiť. Konečná 45-mililitrová vzorka sa vyleje do odmerného valca a nechá sa odstáť 10 minút. Na konci tejto lehoty sa 30 ml supernatantnej tekutiny odsaje a zvyšných 15 ml sa doplní do 45 ml vodou z vodovodu. Po ďalších 10 minútach usadzovania sa 30 ml supernatantnu opäť odsaje a zvyšných 15 ml sa opatrne preleje do Petriho misky alebo do misky na počítanie lariev, na vyšetrenie. Odmerný valec sa premyje v 10 ml vody z vodovodu a tento výplach sa pridá k vzorke do Petriho misky alebo do misky na počítanie lariev, a vyšetrí sa.

- ii) *Zmiešané hromadné vzorky s menej ako 100 vzorkami*

Do celkovej zmiešanej skupinovej vzorky so 100 vzorkami možno pridať najviac 15 jednotlivých vzoriek a vyšetriť spolu s týmito vzorkami. Ak sa vyšetruje viac ako 15 vzoriek a menej ako 100 vzoriek, úmerne sa redukuje tráviaca tekutina.

2. V prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku po vyšetrení skupinovej vzorky, sa odoberie ďalších 20 g vzorky z každej ošípanej v súlade s tým, ako je uvedené vyššie v bode b). Tieto 20-gramové vzorky z piatich ošípaných sa zlúčia a vyšetria podľa vyššie opísanej metódy. Týmto spôsobom sa vyšetria vzorky z 20 skupín po piatich ošípaných. Ak sa v zlúčenej vzorke z piatich ošípaných zistia trichinely, odoberie sa ďalších 20 g vzoriek z jednotlivých ošípaných v skupine a každá sa oddelene vyšetří použitím vyššie opísanej metódy.“

3. Pridajú sa tieto body IV, V a VI:

„IV. METÓDA MECHANICKY PODPOROVANÉHO TRÁVENIA ZLÚČENEJ VZORKY/SEDIMENTAČNÁ TECHNIKA

a) **Prístroje a reagensie**

- nôž alebo nožnice na rezanie vzoriek,
- podnosy, na ktorých je vyznačených 50 štvorcov, na každý z ktorých je možné dať približne 2 g –ové vzorky mäsa,
- Stomacher Lab-blender 3 500 Termo model,
- plastové vrecká vhodné pre Stomacher Lab-blender,
- kužeľový deliaci lievnik s objemom 2 l, pokiaľ možno vybavený teflonovými bezpečnostnými zátkami,
- stojany, kruhy a držiaky,
- sitká, veľkosť otvorov 177 mikrónov, s vonkajším priemerom 11 cm, so sieťkovým dnom z nerezu,
- lievniky s vnútorným priemerom najmenej 12 cm na podporu sietí,
- 100 ml sklenené odmerné valce,
- 25 ml dávkovač,
- kadičky s objemom 3 litre,
- lyžica alebo sklenená tyčinka na miešanie tráviacej tekutiny v kadičke,
- plastová injekčná striekačka a nasávací hadička,
- odmerná lyžica na 6 g,
- teplomer s presnosťou  $\pm 0,5$  °C s rozsahom 1 až 100 °C,
- vibrátor, napr. elektrická miešačka s odnímateľnou hlavicou,
- relé, ktoré spína a vypína v minútovom intervale,
- trichinoskop s horizontálnym stolíkom alebo stereomikroskop, s vhodným svetelným zdrojom,
- miska na počítanie lariev (ak sa použije trichinoskop): miska na počítanie lariev sa vyrobí z akrylových doštičiek o hrúbke 3 mm takto:
  - i) dno nádržky je  $180 \times 40$  mm, vyznačené do štvorcov,
  - ii) bočné steny majú  $230 \times 20$  mm,
  - iii) koniec má  $40 \times 20$  mm. Dno a konce musia byť zasunuté medzi bočné steny, aby tak tvorili misku s dvomi malými rúčkami na obidvoch koncoch. Horná časť dna musí byť zvýšená 7 až 9 mm od základne podstavca vytvoreného bočnými stenami a koncami. Jednotlivé časti sa upevnia použitím lepidla vhodného pre tento materiál,
- niekoľko Petriho misiek s priemerom 9 cm (ak sa použije stereomikroskop) označených na ich dnoch do štvorcových vyšetrovacích plôšok  $10 \times 10$  mm použitím špicateho nástroja,
- 17,5 % roztok kyseliny chlorovodíkovej,
- pepsín s koncentráciou: 1: 10 000 NF (Národný formulár Spojených štátov)  
zodpovedajúci 1: 12 500 BP (Britský liekopis)  
zodpovedajúci 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie),
- niekoľko 10 litrových kontajnerov používaných pri dekontaminácii prístroja, ako je ošetrovanie formalínom, a na zvyškovú tráviacu tekutinu v prípade pozitívnych výsledkov,
- váhy s presnosťou 0,1 g.

**b) Odber vzoriek**

1. V prípade celých tiel sa odoberie približne 2 g vzorka z bráničného piliera na prechode svalov do šlachovitej časti. Ak bráničné piliere chýbajú, odoberú sa vzorky rovnakej veľkosti z rebrovej časti bránice alebo zo sternálnej časti bránice, zo žuvacieho svalu, alebo z brušných svalov.
2. Pri kusoch mäsa sa odoberie približne 2 g vzorka z kostrového svalstva s obsahom malého množstva tuku, a ak je to možné, z blízkosti kostí alebo šliach.

**c) Metóda****1. Postup trávenia****i) Úplné sku pinové vzorky (100 vzoriek súčasne)**

- Stomacher Lab-blender 3 500 vybavený dvojitém plastovým vreckom a kontrolou teploty nastavenou na 40 to 41 °C
- Jeden a pol litra vody predhriatej približne na 32 až 35 °C sa naleje do vnútorného plastového vrečka a voda sa zohreje na 40 to 41 °C.
- potom sa do vody v Stomacheri pridá 25 ml 17,5 % kyseliny chlorovodíkovej.
- potom sa pridá 100 vzoriek, každá je približne 1 g (pri 25 to 30 °C) odobratých z každej jednotlivéj (individuálnej) vzorky, v súlade s bodom b).
- nakoniec sa pridá 6 g pepsínu. Tento postup pridávania sa musí presne dodržiavať, aby sa zabránilo rozkladu pepsínu.
- Stomacher sa potom ponechá spracúvať obsah vrečka počas 25 minút.
- Potom sa plastové vrecko vyberie zo Stomachera a natrávená tekutina sa prefiltruje cez sitko do 3-litrovej kadičky.
- Plastové vrecko sa premyje približne v 100 ml vody, ktorá s potom použije na opláchnutie sitka a nakoniec sa pridá do filtrátu v kadičke.

K celkovej skupinovej vzorke so 100 vzorkami je možné pridať až 15 jednotlivých vzoriek a vyšetriť spolu s týmito vzorkami.

**ii) Menšie skup inové vzorky smenej ako 100 vzorkami**

- Stomacher Lab-blender 3 500 vybavený dvojitém plastovým vreckom a kontrolou teploty nastavenou na 40 až 41 °C.
- Tráviaca tekutina sa pripraví zmiešaním asi jeden a pol litra vody a 25 ml 17,5 % kyseliny chlorovodíkovej. Pridá sa 6 g pepsínu a všetko sa pomieša pri teplote 40 až 41 °C. Tento postup pridávania sa musí presne dodržiavať, aby sa zabránilo rozkladu pepsínu.
- Z tráviacej tekutiny sa odmeria objem zodpovedajúci 15 ml na gram vzorky (napr. pre 30 vzoriek je požadovaný objem 30 × 15 ml alebo 450 ml) a prenesie sa do vnútra tých dvoch plastových vreciek spolu s mäsovými vzorkami o hmotnosti približne 1 g (pri 25 až 30 °C) odobratých z každej z jednotlivých (individuálnych) vzoriek v súlade s bodom b).
- Do vonkajšieho vrečka sa naleje voda približne o teplote 41 °C do celkového objemu v oboch vreckách jeden a pol litra.
- Stomacher sa potom ponechá spracúvať obsah vrečka počas 25 minút.
- Potom sa plastové vrecko vyberie zo stomachera a tráviaca tekutina sa prefiltruje cez sitko do 3-litrovej kadičky.
- Plastové vrecko sa premyje približne v 100 ml vody, ktorá s potom použije na opláchnutie sitka a nakoniec sa pridá do filtrátu v kadičke.

**2. Izolácia lariev sedimentáciou**

- Do tráviacej tekutiny sa pridá ľad (300 až 400 g ľadových vločiek, šupinového ľadu alebo drveného ľadu), až kým objem dosiahne 2 litre. Tráviaca tekutina sa potom mieša dovtedy, kým sa ľad neroztopí.  
V prípade menších zlúčených vzoriek (pozri bod 1 ii)), sa primerane musí zredukovať množstvo ľadu.
- Schladená tráviaca tekutina sa prenesie do 2-litrového deliaceho lievika, vybaveného vibrátorom na osobitnej svorke.

- Sedimentácia trvá 30 minút, počas ktorých sa deliacim lievikom prerušovane vibruje, t. j. za jednou minútou vibrácie nasleduje jedna minúta pauzy.
- Po 30 minútach sa 60 ml vzorky sedimentu rýchlo vypustí do 100 odmerného valca. (Lievik sa po použití vypláchne roztokom detergentu.)
- 60-ml vzorka sa môže nechať odstáť asi 10 minút, potom sa odsaje supernatant, až kým nezostane objem 15 ml, na vyšetrenie na prítomnosť lariev.
- Na odsávanie sa môže použiť jednorázová injekčná striekačka opatrená plastovou hadičkou.  
Dĺžka hadičky má byť taká, aby 15 ml zostalo v odmernom valci, keď okraje injekčnej striekačky spočívajú na obrube valca.
- Zvyšných 15 ml sa vyleje do misky na počítanie lariev alebo do dvoch Petriho misiek a vyšetrí sa, pričom sa použije trichinoskop alebo stereomikroskop.
- Natrávené roztoky je treba vyšetriť, akonáhle sú pripravené. Za žiadnych okolností by sa vyšetrenie nemalo odkladať na nasledujúci deň.

Ak sú tráveniny nedostatočne priehľadné alebo nevyšetrené do 30 minút od ich prípravy, musia sa nasledovne vyčistiť. Finálna 60-mililitrová vzorka sa vyleje do odmerného valca a nechá sa postáť 10 minút. Na konci tejto lehoty sa 45 ml supernatantu odsaje a zvyšných 15 ml sa doplní do 45 ml vodou z vodovodu. Po ďalších 10 minútach usadzovania sa 30 ml supernatantu opäť odsaje a zvyšných 15 ml sedimentu sa opatrne preleje do Petriho misky alebo do misky na počítanie lariev, a vyšetrí sa. Odmerný valec by sa vymyje 10 ml vody z vodovodu a tento výplach sa pridá do Petriho misky alebo do misky na počítanie lariev, a vyšetrí sa.

3. V prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku po vyšetrení skupinovej vzorky, sa odoberie ďalších 20 g vzorky z každej ošipanaj v súlade s tým, ako je uvedené vyššie v bode b). Tieto 20-gramové vzorky z piatich ošipaných sa zlúčia a vyšetrí podľa vyššie opísanej metódy. Týmto spôsobom sa vyšetrí vzorky z 20 skupín po piatich ošipaných. Ak sa v zlúčenej vzorke z piatich ošipaných zistia trichinely, odoberie sa ďalších 20 g vzoriek z jednotlivých ošipaných v skupine a každá sa vyšetrí oddelene s použitím vyššie opísanej metódy.

#### V. METÓDA MECHANICKY PODPOROVANÉHO TRÁVENIA ZLÚČENEJ VZORKY/TECHNIKA 'IZOLÁCIE NA FILTRI'

##### a) Prístroje a reagentie

Tie, ktoré sú uvedené v metóde IV a).

Dodatočné vybavenie k vyššie uvedenému vybaveniu:

- 1-litrový Gelmanov lievik, spolu s držiakom filtra (priemer 45 mm),
- filtračné kotúče; filtračné kotúče pozostávajú z:  
kruhového sita z nehrdzavejúcej ocele s otvormi 35 mikrónov (priemer kotúča musí byť 45 mm),  
dvoch gumových krúžkov vyhotovených z gumy o hrúbke 1 mm (vonkajší priemer je 45 mm a vnútorný priemer 38 mm),  
kruhové sito sa umiestni medzi dva gumové krúžky a pripevní sa k nim pomocou dvojzložkového lepidla vhodného pre tieto dva materiály,
- Erlenmayerová banka s obsahom 3 litre a vybavená bočnou trubicou na odsávanie,
- filtračná pumpa,
- plastové vrecká s obsahom najmenej 80 ml,
- zariadenie na uzatváranie plastových vreciek,
- reniláza s aktivitou: 1: 150 000 soxhletových jednotiek na gram.

##### b) Odber vzoriek

Pozri metódu IV b).

c) **Metóda**1. *Postup trávenia*

- i) Kompletné zlúčené vzorky (100 vzoriek súčasne)  
Pozri metódu IV c) (1) i).
- ii) Menšie zlúčené vzorky smenej ako 100 vzorkami  
Pozri metódu IV c) (1) ii).

2. *Izolácia lariev filtráciou*

- Do tráviacej tekutiny sa pridá ľad (300 až 400 g ľadových vločiek, šupinového ľadu alebo drveného ľadu), až kým objem dosiahne 2 litre.  
V prípade menších zlúčených vzoriek, sa primerane musí zredukovať množstvo ľadu.
- Tráviaca tekutina sa potom mieša dovtedy, kým sa ľad neroztopí. Schladená tráviaca tekutina sa potom nechá stáť najmenej tri minúty, aby sa larvy mohli stočiť.
- Gelmanov lievik, spolu s držiakom filtra a filtračným kotúčom, sa nasadí na Erlenmeyerovu banku pripojenú k filtračnej pumpke.
- Tráviaca tekutina sa naleje do Gelmanovho lievika a prefiltruje sa. Ku koncu filtrácie sa prechodu tráviacej tekutiny cez filter môže napomáhať použitím odsávania filtračnou pumpou. Odsávanie treba ukončiť pred vysušením filtra, t. j. keď v lieviku zostane 2 až 5 ml tekutiny.
- Ak je všetka tráviaca tekutina prefiltrovaná, filtračný kotúč sa odstráni a uloží sa do plastového vrečka s obsahom 80 ml spolu s 15 až 20 ml roztoku renilázy. Roztok renilázy sa pripraví pridaním 2 g renilázy do 100 vody z vodovodu.
- Plastové vrečko sa dvakrát uzatvorí a umiestni sa do Stomachera medzi vnútorné a vonkajšie vrečko.
- Stomacher to potom ponechá spracúvať tri minúty, napr. kým pracuje na kompletnej alebo nekompletnej zmiešanej vzorke.
- Po troch minútach sa plastové vrečko spolu s filtračným kotúčom a roztokom renilázy odstráni zo stomachera a otvorí nožnicami. Tekutý obsah sa vyleje do misky na počítanie lariev alebo do Petriho misky. Vrečko sa premyje s 5 až 10 ml vody, ktorá s potom pridá do misky na počítanie lariev na vyšetrenie trichinoskopom alebo do Petriho misky na vyšetrenie stereomikroskopom.
- Tráveniny by sa mali vyšetriť, akonáhle sú pripravené. Za žiadnych okolností by sa vyšetrenie nemalo odložiť na nasledujúci deň.

*Poznámka:*

Filtračné kotúče by sa nikdy nemali použiť, ak nie sú úplne čisté. Nikdy by sa nemalo povoliť, aby sa nečisté kotúče vysušali.

Filtračné kotúče sa môžu vyčistiť tak, že sa cez noc nechajú v roztoku renilázy. Pred použitím sa musia premyť v čerstvom roztoku renilázy s použitím stomachera.

- 3. V prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku po vyšetrení skupinovej vzorky, sa musí odoberať ďalších 20 g vzorky z každej ošípanej v súlade s tým, ako je uvedené vyššie v bode b). Tieto 20-gramové vzorky z piatich ošípaných sa zlúčia a vyšetria podľa vyššie opísanej metódy. Týmto spôsobom sa vyšetria vzorky z 20 skupín po piatich ošípaných. Ak sa v zlúčenej vzorke z piatich ošípaných zistia trichinely, odoberie sa ďalších 20 g vzoriek z jednotlivých ošípaných v skupine a každá sa oddelene vyšetří použitím vyššie opísanej metódy.

## VI. METÓDA MAGNETICKÉHO MIEŠANIA PRI TRÁVENÍ ZLÚČENÝCH VZORIEK

a) **Prístroje a reagensie**

- nôž a pinzety na rezanie vzoriek,
- podnosy, na ktorých je vyznačených 50 štvorcov, na každý z ktorých je možné dať približne s 2 g –ové vzorky mäsa,
- mixér Moulinette,
- magnetické miešačky, s termostaticky kontrolovanou vyhrievacou platňou a teflónom potiahnutými miešacími tyčkami s dĺžkou 5 cm,

- kužeľový deliaci lievik s objemom 2 l,
- stojany, kruhy a držiaky,
- sitká, veľkosť otvorov 177 mikrónov, s vonkajším priemerom 11 cm, z nerezu,
- lieviky s vnútorným priemerom najmenej 12 cm na podporu sieťok,
- kadička s kapacitou 3 litre,
- odmerné valce s objemom približne 50 ml, alebo centrifugačné skúmavky,
- a trichinoskop s horizontálnym stolíkom alebo stereomikroskop, s vhodným svetelným zdrojom,
- miska na počítanie lariev (ak sa použije trichinoskop): miska na počítanie lariev sa vyrobí z akrylových doštičiek o hrúbke 3 mm takto:
  - i) dno nádržky je 180 × 40 mm, vyznačené do štvorcov,
  - ii) bočné steny majú 230 × 20 mm,
  - iii) koniec má 40 × 20 mm. Dno a konce musia byť zasunuté do strán, aby tak tvorili misku s dvomi malými rúčkami na obidvoch koncoch. Horná časť dna musí byť zvýšená 7 až 9 mm od základne podstavca vytvoreného stenami a koncami. Jednotlivé časti sa upevnia použitím lepidla vhodného pre tento materiál,
- niekoľko Petriho misiek s priemerom 9 cm (ak sa použije stereomikroskop) označených na ich dnoch do štvorcových vyšetrovacích plôšok 10 x 10 mm použitím špicateho nástroja,
- hliníková fólia,
- 25 % kyselina chlorovodíková,
- pepsín s koncentráciou: 1: 10 000 NF (Národný formulár Spojených štátov)  
zodpovedajúci 1: 12 500 BP ((Britský liekopis)  
zodpovedajúci 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie),
- voda z vodovodu zohriata na 46 až 48 °C,
- niekoľko 10 litrových kontajnerov používaných pri dekontaminácii prístroja, ako je ošetrovanie formalínom, a na zvyškovú tráviacu tekutinu v prípade pozitívnych výsledkov,
- váhy s presnosťou 0,1 g.

#### b) **Odber vzoriek**

1. V prípade celých tiel sa odoberie približne 2 g vzorka z bráničného piliera na prechode svalov do šlachovitej časti. Ak bráničné piliere chýbajú, odoberú sa vzorky rovnakej veľkosti z rebrovej časti bránice alebo zo sternálnej časti bránice, zo žuvacieho svalu, alebo z brušných svalov.
2. Pri kusoch mäsa sa odoberie približne 2 g vzorka z kostrového svalstva s obsahom malého množstva tuku, a ak je to možné, z blízkosti kostí alebo šliach.

#### c) **Metóda**

1. i) *Kompletné zlučenie vzorky (100 vzoriek súčasne)*
  - 100 vzoriek, každá približne 1 g, odobratých z každej z jednotlivých vzoriek, v súlade s bodom b), sa rozseká v mixéri Moulinette. Rezačka má pritom byť v činnosti tri až štyri razy počas doby približne jednej sekundy.
  - Posekané mäso sa preniesie do 3 litrovej kadičky a posype sa 10 g pepsínu. Do kadičky sa nalejú 2 litre vody z vodovodu, predhriatej na 46 až 48 °C, spolu so 16 ml kyseliny chlorovodíkovej.
  - Rezací vložka rezačky Moulinette sa opakovane ponorí do tráviacej tekutiny v kadičke, aby sa akékoľvek mäso, ktoré je ešte prilepené, dostalo do tráviacej tekutiny.
  - Do kadičky sa vloží miešacia tyčka a kadička sa zakryje hliníkovou fóliou.



- Kadička sa položí na predhriatu platňu magnetickej miešačky a začne sa proces miešania. Magnetická miešačka sa pred začatím procesu miešania nastaví tak, aby udržiavala stálu teplotu 44 to 46 °C počas doby celej činnosti. Počas procesu miešania musí tráviaca tekutina rotovať pri dostatočnej rýchlosti, aby sa vytvoril hlboký vír bez striekania.
- Tráviaca tekutina sa mieša počas 30 minút, po skončení tejto doby sa miešačka vypne a tráviaca tekutina sa preleje cez sitko do sedimentačného lievika.
- Tráviaca tekutina sa ponechá v lieviku postáť 30 minút.
- Po 30 minútach sa 40 ml vzorky tráviacej tekutiny rýchlo vypustí do odmerného valca alebo centrifugačnej skúmavky.
- 40 ml vzorky sa môže nechať postáť 10 minút, po skončení tejto doby sa odsatím odoberie 30 ml prebytočnej tekutiny (supernatantu), pričom zostane objem 10 ml.
- Zvyšných 10 ml vzorky sedimentu sa preleje do nádržky na počítanie lariev alebo do Petriho misky.
- Potom sa valec alebo odstredovacia hadica opláchne približne s 10 ml vody z vodovodu, ktorá sa pridá do vzorky do nádržky na počítanie lariev alebo do Petriho misky. Následne sa vzorka vyšetrí trichinoskopom alebo stereomikroskopom.
- Trávenina by sa mala vyšetriť, akonáhle je pripravená. Za žiadnych okolností by sa vyšetrovanie nemalo odložiť na nasledujúci deň.

Ak sa tráveniny nevyšetrí do 30 minút od ich prípravy, musia sa nasledovne vyčistiť. Finálna vzorka asi so 40 ml sa vyleje do odmerného valca a nechá sa postáť 10 minút, po tomto čase sa odoberie 30 ml supernatantu tak, že zostane objem 10 ml. Tento objem sa doplní do 40 ml vodou z vodovodu. Po ďalších 10 minútach usadzovania sa odsaje 30 ml supernatantu tekutiny tak, že v Petriho miske alebo miske na počítanie lariev zostane objem 10 ml na vyšetrovanie. Odmerný valec by sa premyje v 10 ml vody z vodovodu a tento výplach sa pridá do Petriho misky alebo do misky na počítanie lariev, a vyšetrí sa.

Ak sa zistí, že usadenina pri vyšetrovaní nie je číra, vzorka sa preleje do odmerného valca a doplní sa do objemu 40 ml vodou z vodovodu a potom nasleduje vyššie uvedený postup.

ii) *Zlúčené vzorky s menej ako 100 vzorkami*

V prípade potreby sa do celkovej zlúcenej vzorky so 100 vzorkami pridá najviac 15 jednogramových vzoriek, a vyšetrí sa spolu s touto vzorkou podľa c) (1) i). Ako kompletne zmiešané vzorky možno vyšetriť viac ako 15 vzoriek. V prípade zlúčených vzoriek do 50 vzoriek sa tráviaca tekutina môže redukovať na 1 liter.

2. V prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku po vyšetrovaní hromadnej vzorky sa odoberie ďalších 20 g vzorky z každej ošípanej v súlade s tým, ako je uvedené vyššie v bode b). Tieto 20-gramové vzorky z piatich ošípaných sa zlúčia a vyšetrí podľa vyššie opísanej metódy. Týmto spôsobom sa vyšetrí vzorky z 20 skupín po piatich ošípaných. Ak sa v zlúcenej vzorke z piatich ošípaných zistia trichinely, odoberie sa ďalších 20 g vzoriek z jednotlivých ošípaných v skupine a každá sa oddelene vyšetrí použitím vyššie opísanej metódy.

B. Príloha II, kapitola I, odsek 1 sa týmto mení a dopĺňa takto:

1. Text v bode b) sa nahrádza týmto textom:

„b) uzamykateľnú miestnosť primerane vybavenú na vyšetrovanie vzoriek, ktorá sa dá zatieniť pri vykonávaní vyšetrovania trichinoskopom;“

2. Bod f) sa vypúšťa; body g), h), i), j), k), l), m) a n) budú jednotlivito bodmi f), g), h), i), j), k), l) a m).

3. Text v novom bode g) sa nahrádza týmto textom:

„g) umyváreň na umývanie a dezinfekciu vyšetrovacieho zariadenia (napr. kontajnerov na vzorky, kompresorov, nožov a nožníc) s:

- vodotesnou, voči hnilobe odolnou, ľahko umývateľnou a dezinfikovateľnou podlahou,
- hladkými stenami, ktoré sú do výšky najmenej 2 metrov opatrené umývateľným obkladom alebo náterom svetlej farby.

Toto ustanovenie sa nemusí uplatňovať, ak sa použijú metódy uvedené v bodoch II, III, IV, V, VI prílohy I za predpokladu, že laboratóriá sú vybavené veľkým vhodne nainštalovanými výlevkami.“

---