

31984L0319

L 167/34

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

27.6.1984

DIREKTIVA KOMISIJE
z dne 7. junija 1984
o spremembi prilog k Direktivi Sveta 77/96/EGS o pregledu na trihinele (*trichinella spiralis*) pri uvozu
svežega mesa domačih prašičev iz tretjih držav

(84/319/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 77/96/EGS z dne 12. decembra 1976 o pregledu na trihinele (*trichinella spiralis*) pri uvozu svežega mesa domačih prašičev iz tretjih držav ⁽¹⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 83/91/EGS ⁽²⁾, in zlasti člena 8 Direktive,

ker so nedavne študije omogočile izoblikovanje nekaterih metod za odkritje prisotnosti trihinel v prašičjem mesu; ker je zanesljivost teh metod z vidika zdravstvenega varstva enakovredna zanesljivosti obstoječih metod; ker je torej treba Prilogo I k Direktivi 77/96/EGS ustrezno dopolniti;

ker je treba državam nečlanicam in državam članicam dovoliti, da izbirajo med razpoložljivimi preiskovalnimi metodami, da bi se olajšalo delo pri pregledu na trihinele;

ker je treba v metode za preiskavo na trihinele, ki se trenutno uporabljajo, vnesti ustrezne tehnične spremembe v zvezi s pogoji, ki jih morajo laboratoriji, ki se ukvarjajo z odkrivanjem prisotnosti trihinel, izpolnjevati;

ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega veterinarskega odbora,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Direktiva 77/96/EGS se spremeni, kakor je določeno v Prilogi.

Člen 2

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 1. januarja 1985. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Člen 3

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 7. junija 1984

Za Komisijo

Poul DALSAGER

Član Komisije

⁽¹⁾ UL L 26, 31.1.1977, str. 67.

⁽²⁾ UL L 59, 5.3.1983, str. 34.

PRILOGA

A. Priloga I se spremeni:

1. V točki II(a):

— deseta alineja se nadomesti z:

„— stereomikroskop (povečava od 15 do 40x) z ustreznim svetlobnim virom,“

— zadnja alineja se nadomesti z:

„— digestivna tekočina vsebuje naslednje:

10 g pepsina (80 u/g FIP: Fédération internationale de pharmacie), 5 ml HCl (najmanj 37 %) in tekočo vodo, dolito do enega litra.“

2. Točka III se nadomesti z:

„III. METODA Z UPORABO UMETNE PREBAVE ZBIRNIH VZORCEV

(a) **Oprema in reagenti**

- nož in pinceta za odvzem vzorcev,
- strojček za mletje mesa z luknjami s premerom od 2 do 3 mm,
- 3 litrska erlenmajerica z gumijastim čepom ali čepom iz vate,
- koničasti ločilni lijak s prostornino 2 000 ml,
- navadno namizno stojalo z A nogo, dolžine približno 28 cm z 80 cm drogom,
- obroč s premerom od približno 10 do 11 cm, ki se lahko pritrdi na stojalo,
- objemka s ploščatim primežem (23 x 40 mm), ki se lahko na stojalo pritrdi z dvojno spojko,
- sito (širina mreže 177 mikronov) z zunanjim premerom 11 cm in mrežo iz bronca ali nerjavečega jekla,
- plastični lijak z notranjim premerom najmanj 12 cm,
- 100 ml stekleni merilni valji,
- stereomikroskop (povečava 15 do 40x) z ustreznim svetlobnim virom ali trihinoskop s horizontalno ploščo za kompresijsko ploščo z ustreznim svetlobnim virom,
- pri uporabi trihinskopa: se uporabi posoda za štetje ličink, ki se opiše na naslednji način:
 - posoda za štetje ličink je iz 3 mm debelih akrilnih plošč, in sicer:
 - (i) dno posode mora znašati 180 × 40 mm, razdeljeno v kvadrate;
 - (ii) daljše stranice morajo biti 230 x 20 mm;
 - (iii) krajše stranice morajo biti 40 × 20 mm. Dno in daljše stranice morajo biti vstavljeni med daljše stranice tako, da tvorijo posodo z dvema ročicama na obeh koncih. Zgornji del dna se mora dvigniti za 7 do 9 mm od dna ogrodja, ki ga tvorijo daljše in krajše stranice. Deli naj bodo zlepljeni z lepilom, ki je za ta material primerno,
- več petrijevk (pri uporabi stereomiskropa), katerih spodnja stran se s koničastim orodjem označi v kvadratna preiskovalna polja po 10 x 10 mm,
- več 10 litrskih posod za smeti, ki so potrebne pri dekontaminaciji, npr. pri obdelavi priprave s formalinom, in za odvečno digestivno tekočino v primeru pozitivnih rezultatov,
- koncentrirana (37 %) klorovodikova kislina,
- pepsin z močjo: 1:10 000 NF (US National Formulary),
 - kar ustreza 1: 12 500 BP (British Pharmacopoea),
 - kar ustreza 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie),
- nekaj pladnjev, ki lahko držijo 50 vzorcev po približno 2 g,
- tehtnica z natančnostjo 0,1 g.

(b) Odvzem vzorcev

1. Pri celih trupih je treba iz preponskega stebra pri prehodu v mišični del vzeti približno 2 g vzorec. Če ni preponskih stebrov, se enak vzorec vzame iz rebrnega dela ali prsničnega dela prepone, iz jezične ali čeljustne mišice oziroma iz trebušne muskulature.
2. Od vsakega kosa mesa se vzame približno 2 g vzorec skeletne mišice z malo maščobe in, če je mogoče, v bližini kosti ali kit.

(c) Metoda**1. (i) Popolni skupki (100 vzorcev hkrati)**

Od vsakega od 100 posameznih vzorcev prašičev se vzame približno 1 g vzorec. Zbirni vzorec se enkrat da skozi strojček za mletje mesa.

Zmleto meso se položi v 3 litrsko erlenmajerico skupaj s 7 g pepsina, približno 2 litroma tekoče vode, segrete na približno 40 do 41 °C, in 25 ml koncentrirane klorovodikove kisline. Mešanica se pretrese, da se pepsin raztopi.

PH vrednost raztopine znaša od približno 1,5 do 2.

- Zaradi prebave se erlenmajerica približno štiri ure inkubira pri 40 do 41 °C. Steklenica se med časom inkubacije redno pretrese, najmanj dvakrat na uro.
- Raztopina za prebavo se prefiltrira skozi sito v koničasti 2 litrski ločilni lijak in se nemoteno pusti na stojalu najmanj eno uro.
- Skupno se v merilni valj izpusti približno 45 ml, kar se porazdeli v tri petrijevke po 15 ml, katerih dno mora biti razdeljeno v kvadrate.
- Vsaka petrijevka se pod stereomikroskopom podrobno pregleda za ličinke trihinele.
- Če se uporabljajo posode za štetje ličink, se 45 ml razporedi na dve posodi za štetje ličink in pregleda pod trihinoskopom.

Ličinke so v usedlini razločljive; če je voda mlačna, lahko vidimo njihovo 'spiralno' zvijanje in razvijanje.

- Vzorec se pregleda takoj, ko je pripravljen. V nobenem primeru se pregled ne sme prestaviti na naslednji dan.

Če so vzorci motni ali pa niso bili pregledani v 30 minutah po njihovi pripravi, se razbistrijo na naslednji način. Končni vzorec 45 ml se zlije v merilni valj in pusti stati 10 minut. Po izteku tega časa se 30 ml supernatanta (bistre tekočine) odvzame s pipetiranjem, preostalim 15 ml pa se dolije tekoča voda do 45 ml. Po nadaljnjem usedanju 10 minut se 30 ml supernatanta (bistre tekočine) odvzame s pipetiranjem, preostalim 15 ml za pregled pa vlije v petrijevko ali posodo za štetje ličink. Merilni valj se izplakne z 10 ml tekoče vode, to pa se doda k vzorcu, ki je pripravljen za pregled v petrijevki ali posodi za štetje ličink.

(ii) Skupki manj kot 100 vzorcev

K skupku 100 vzorcev se lahko doda 15 posameznih vzorcev, ki se pregledajo skupaj s temi vzorci. Pri pregledu več kot 15 vzorcev in manj kot 100 vzorcev se digestivna tekočina ustrezno zmanjša.

2. V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata po pregledu zbirnega vzorca se od vsakega prašiča vzame nadaljnjih 20 g vzorca v skladu z zgornjo točko (b). Vzorci po 20 g, vzeti od petih prašičev, se združijo in pregledajo po zgoraj opisani metodi. Na ta način bodo pregledani vzorci 20 skupin po pet prašičev. Če se v zbirnem vzorcu, vzetem od petih prašičev, odkrije prisotnost trihinele, se od posameznih prašičev iz skupine odvzame nadaljnjih 20 g vzorca, pri čemer se vsak pregleda po zgoraj opisani metodi.“

3. Dodajo se naslednje točke IV, V in VI:

„IV. METODA PREBAVE ZBIRNEGA VZORCA Z MEHANSKO POMOČJO/SEDIMENTACIJSKA TEHNIKA

(a) **Oprema in reagenti**

- nož ali škarje za odvzem vzorcev,
- pladnji, razdeljeni v 50 kvadratov, od katerih vsak lahko drži vzorec po približno 2 g mesa,
- mešalec Stomacher Lab 3 500 Thermo model,
- plastične vrečke, ki so primerne za mešalec Stomacher Lab,
- koničasti ločilni lijaki s prostornino 2 litrov, po možnosti opremljeni s teflonskimi varnostnimi čepi,
- stojala, vijaki in objemke,
- sita iz nerjavečega jekla z velikostjo mreže 177 mikronov in zunanjim premerom 11 cm,
- lijak z notranjim premerom najmanj 12 cm za podporo sit,
- 100 ml stekleni merilni valji,
- 25 ml razdeljevalec,
- čaše s 3 litrsko prostornino,
- žlica ali steklena paličica za mešanje digestivne tekočine v čaši,
- plastična brizgalka in pipeta,
- merilna žlica za 6 g,
- termometer z natančnostjo $\pm 0,5$ °C v obsegu od 1 do 100 °C,
- vibrator, npr. električni brivnik brez glave,
- rele, ki se vključi in izključi v časovnih razmakih ene minute,
- trihinoskop s horizontalno ploščo ali stereomikroskop z ustreznim svetlobnim virom,
- posoda za štetje ličink (ob uporabi trihinskopa): posoda za štetje ličink je iz 3 mm debelih akrilnih ploščic, in sicer:
 - (i) dno posode mora znašati 180 × 40 mm, razdeljeno v kvadrate;
 - (ii) daljše stranice morajo biti 230 × 20 mm;
 - (iii) krajše stranice morajo biti 40 × 20 mm. Dno in krajše stranice morajo biti vstavljene med daljše stranice tako, da tvorijo posodo z dvema ročicama na obeh koncih. Zgornji del dna se mora dvigniti za 7 do 9 mm od dna ogrodja, ki ga tvorijo daljše in krajše stranice. Deli naj bodo zlepljeni z lepilom, ki je za ta material primerno,
- več petrijevk s premerom 9 cm (pri uporabi stereomikroskopa), katerih spodnja stran se s koničastim orodjem označi v kvadratna preiskovalna polja 10 × 10 mm,
- 17,5 % raztopine klorovodikove kisline,
- pepsin z močjo 1:10 000 NF (US National Formulary),
 - kar ustreza 1:12 500 BP (British Pharmacopoea),
 - kar ustreza 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie),
- več 10 litrskih posod za smeti, ki so potrebne pri dekontaminaciji, npr. pri obdelavi priprave s formalinom, in za odvečno digestivno tekočino v primeru pozitivnih rezultatov,
- tehtnica z natančnostjo 0,1 g.

(b) Odvzem vzorcev

1. Pri celih trupih je treba iz preponskega stebra pri prehodu v mišični del vzeti približno 2 g vzorec. Če ni preponskih stebrov, se enak vzorec vzame iz rebrnega dela ali prsničnega dela prepone, iz jezične ali čeljustne mišice oziroma iz trebušne muskulature.
2. Od vsakega kosa mesa se vzame približno 2 g vzorec skeletne mišice z malo maščobe in, če je mogoče, v bližini kosti ali kit.

(c) Metoda1. *Postopek prebave*(i) *Popolni skupki (100 vzorcev naenkrat)*

- Mešalec Stomacher Lab 3 500 naj bo opremljen z dvojno plastično vrečko, temperaturno kazalo pa naj bo nastavljeno na 40 do 41 °C.
- V notranjo plastično vrečko se vlije liter in pol vode, ki je bila segreta na 32 do 35 °C, ter se jo segreje na 40 do 41 °C.
- Vodi v Stomacher se nato doda 25 ml 17,5 % klorovodikove kisline.
- Nato se doda 100 vzorcev po približno 1 g (pri 25 do 30 °C), ki so bili vzeti od posameznih vzorcev v skladu z zgornjo točko (b).
- Nazadnje se doda še 6 g pepsina. Tega vrstnega reda se je treba strogo držati, da se izognete razkroju pepsina.
- Stomacher naj nato 25 minut melje vsebino.
- Nato se iz Stomacherja odstrani plastična vrečka, digestivna tekočina pa se prefiltrira skozi sito v 3 litrsko čašo.
- Plastična vrečka se oplakne s približno 100 ml vode, s katero se nato splakne sito in nazadnje doda filtratu v čašo.

K skupku 100 vzorcev se lahko doda 15 posameznih vzorcev, ki se pregledajo skupaj s temi vzorci.

(ii) *Manjši skupki z manj kot 100 vzorci*

- Mešalec Stomacher Lab 3 500 naj bo opremljen z dvojno plastično vrečko, temperaturno kazalo pa naj bo nastavljeno na 40 do 41 °C.
- Digestivno tekočino se pripravi tako, da se zmeša en liter in pol vode ter 25 ml 17,5 % klorovodikove kisline. Dodaja se 6 g pepsina in vse skupaj zmeša pri temperaturi od 40 do 41 °C. Strogo se je treba držati tega vrstnega reda, da se izognete razkroju pepsina.
- Od digestivne tekočine se odmeri količina, ki ustreza 15 ml na gram vzorca (npr. za 30 vzorcev se zahteva količina 30 × 15 ml ali 450 ml), ki se doda v obe plastični vrečki skupaj z vzorci mesa po približno 1 g (pri 25 do 30 °C), vzetih od posameznih vzorcev v skladu z zgornjo točko (b).
- Voda pri temperaturi približno 41 °C se vlije v zunanjo vrečko, dokler v obeh vrečkah skupna prostornina ne znaša en liter in pol.
- Stomacher nato 25 minut melje vsebino vrečke.
- Plastična vrečka se nato odstrani iz Stomacherja, digestivna tekočina pa se prefiltrira skozi sito v 3 litrsko čašo.
- Plastična vrečka se splakne s približno 100 ml vode, s katero se nato splakne sito in nazadnje doda filtratu v čašo.

2. *Ugotavljanje prisotnosti ličink s sedimentacijo*

- Digestivni tekočini se doda led (300 do 400 g ledenih ploščic, ledenega praška ali zdrobljenega ledu), da se njen volumen poveča na dva litra. Digestivno tekočino se nato meša, dokler se led ne raztopi.
Pri manjših skupkih (glej 1 (ii)) se količina ledu ustrezno zmanjša.
- Ohlajena digestivna tekočina se prenese v dvolitrski ločilni lijak, ki je opremljen z vibratorjem, pritrjenim s posebno objemko.

- 30 minutna sedimentacija, med katero sedimentacijski lijak prekinjeno vibrira, to pomeni enominutna vibracija, kateri sledi enominutni premor.
- Po 30 minutah se 60 ml vzorec sedimenta hitro odplakne v 100 ml merilni valj. (Lijak se po uporabi splakne z raztopino detergenta).
- 60 ml vzorec se pusti stati najmanj 10 minut, nakar se supernatant (bistra tekočina) odzame s pipetiranjem, ostane pa volumen 15 ml, ki se pregleda na prisotnost ličink.
- Za pipetiranje se lahko uporabi brizgalka za enkratno uporabo, opremljena s plastično cevko.

Dolžina cevke mora biti tolikšna, da bo 15 ml ostalo v merilnem valju, ko po pipetiranju brizgalka ostane na obroču valja.
- Preostalih 15 ml se odlije v posodo za štetje ličink ali v dve petrijevki ter pregleda s trihinoskopom ali stereomikroskopom.
- Pripravek se pregleda takoj, ko je pripravljen. V nobenem primeru se pregled ne sme prestaviti na naslednji dan.

Če so vzorci motni ali pa niso bili pregledani v 30 minutah po njihovi pripravi, se razbistrijo na naslednji način. Končni vzorec 60 ml se vlije v merilni valj in pusti stati 10 minut. Po izteku tega časa se 45 ml supernatanta (bistre tekočine) odzame s pipetiranjem, preostalim 15 ml pa se dolije tekoča voda do 45 ml. Po nadaljnjem usedanju 10 minut se 30 ml supernatanta (bistre tekočine) odzame s pipetiranjem, preostalih 15 ml za pregled pa se vlije v petrijevko ali posodo za štetje ličink. Merilni valj se izplakne z 10 ml tekoče vode, to pa se doda k vzorcu v petrijevki ali posodi za štetje ličink, ki je pripravljen za pregled.

3. V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata po pregledu zbirnega vzorca se od vsakega prašiča vzame nadaljnjih 20 g vzorca v skladu z zgornjo točko (b). Vzorca po 20 g, vzeti od petih prašičev, se združijo in pregledajo po zgoraj opisani metodi. Na ta način bodo pregledani vzorci 20 skupin po pet prašičev. Če se v zbirnem vzorcu, vzetem od petih prašičev, odkrije prisotnost trihinel, se od posameznih prašičev iz skupine odzame nadaljnjih 20 g vzorcev, pri čemer se vsak pregleda po zgoraj opisani metodi.

V. METODA PREBAVE ZBIRNEGA VZORCA Z MEHANSKO POMOČJO/TEHNIKA 'IZOLACIJA NA FILTRU'

(a) Oprema in reagenti

Tiste, ki so navedene pod metodo IV(a).

Dodatna oprema k zgoraj navedeni:

- 1 litrski Gelman lijak skupaj z držalom za filter (premer 45 mm),
- filtrirni diski; filtrirni diski so sestavljeni iz:
 - okrogle mreže iz nerjavečega jekla z odprtino 35 mikronov (premer diska naj bo 45 mm),
 - dveh gumijastih obročev iz 1 mm debele gume (zunanji premer naj bo 45 mm, notranji premer pa 38 mm),
 - okrogla mreža se položi med oba gumijasta obroča in nanju pritrdi z uporabo dvokomponentnega lepila, ki je primerno za oba materiala,
- erlenmajerica s prostornino treh litrov, ki je opremljena s stransko cevko za pipetiranje,
- filtrirna črpalka,
- plastične vrečke s prostornino najmanj 80 ml,
- oprema za zapiranje plastičnih vrečk,
- rennilase z močjo 1:150 000 soxhlet enot na gram.

(b) Odvzem vzorcev

Glej metodo IV(b).

(c) **Metoda**

1. *Postopek prebave*

(i) Popolni skupki (100 vzorcev hkrati)

Glej metodo IV(c)(1)(i).

(ii) Manjši skupki z manj kot 100 vzorci

Glej metodo IV(c)(1)(ii).

2. *Ugotavljanje prisotnosti ličink s filtracijo*

— Digestivni tekočini se doda led (300 do 400 g ledenih ploščic, ledenega praška ali zdrobljenega ledu), ki njen volumen poveča na približno dva litra.

Pri manjših skupkih se količina ledu ustrezno zmanjša.

— Digestivna tekočina se nato meša, dokler se led ne raztopi. Ohlajena digestivna tekočino se nato pusti stati najmanj tri minute, da se ličinke zvijejo.

— Gelman lijak, opremljen z držalom za filter in filtrirnim diskom, se pritrdi na erlenmajerico, ki je povezana s filtrirno črpalko.

— Digestivna tekočina se vlije v Gelman lijak in prefiltrira. Proti koncu filtracije prehod digestivne tekočine skozi filter lahko olajša uporaba filtrirne črpalke. Pipetiranje se mora zaključiti, preden se filter osuši, to pomeni, ko v lijaku ostane 2 do 5 ml tekočine.

— Ko je vsa digestivna tekočina prefiltrirana, se filtrirni disk odstrani in položi v plastično vrečko s prostornino 80 ml skupaj s 15 do 20 ml rennilase raztopine. Rennilase raztopina se naredi tako, da se 2 g rennilase doda k 100 ml tekoče vode.

— Plastična vrečka se dvakrat zapečati in vloži v Stomacher med notranjo in zunanjo vrečko.

— Stomacher naj melje tri minute, npr. medtem ko dela na popolnem ali nepopolnem vzorcu.

— Po treh minutah se plastična vrečka skupaj s filtrirnim diskom in rennilase raztopino odstrani iz Stomacherja in odpre s škarjami. Tekoča vsebina se vlije v posodo za štetje ličink ali petrijevko. Vrečka se splakne s 5 do 10 ml vode, ki se nato doda v posodo za štetje ličink za pregled pod trihinoskopom ali v petrijevko za pregled s stereomikroskopom.

— Pripravek se pregleda, takoj ko je pripravljen. V nobenem primeru se pregled ne sme prestaviti na naslednji dan.

Opomba:

Filtrirni diski se ne smejo uporabljati, če niso popolnoma čisti. Diski se nikoli ne smejo posušiti v nečistem stanju.

Filtrirni diski se lahko očistijo tako, da se čez noč pustijo v rennilase raztopini. Pred uporabo jih je treba očistiti v sveži rennilase raztopini z uporabo Stomacherja.

3. V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata po pregledu zbirnega vzorca se od vsakega prašiča vzame nadaljnjih 20 g vzorca v skladu z zgornjo točko (b). Vzorci po 20 g, vzeti od petih prašičev, se združijo in pregledajo po zgoraj opisani metodi. Na ta način bodo pregledani vzorci 20 skupin po pet prašičev. Če se v zbirnem vzorcu, vzetem od petih prašičev, odkrije prisotnost trihinel, se od posameznih prašičev iz skupine odvzame nadaljnjih 20 g vzorcev, pri čemer se vsak pregleda po zgoraj opisani metodi.

VI. METODA PREBAVE ZBIRNEGA VZORCA Z MAGNETNIM MEŠANJEM

(a) **Oprema in reagenti**

— nož in pinceta za odvzem vzorcev,

— pladnji, razdeljeni v 50 kvadratov, od katerih vsak lahko drži vzorec po približno 2 g mesa,

— mešalec Moulinette,

— magnetni mešalci s termostatsko nadzorovano grelno ploščo in s približno 5 cm dolgimi mešalnimi paličicami, prevlečenimi s teflonom,

- konični ločilni lijaki z dvolitrsko prostornino,
- stojala, vijaki in objemke,
- sita iz nerjavečega jekla z velikostjo mreže 177 mikronov in zunanjim premerom 11 cm,
- lijak z notranjim premerom najmanj 12 cm za podporo sit,
- čaše s 3 litrsko prostornino,
- merilni valji s prostornino približno 50 ml ali centrifugalne epruvete,
- trihinoskop s horizontalno ploščo ali stereomikroskop z ustreznim svetlobnim virom,
- posoda za štetje ličink (ob uporabi trihinoskopa): posoda za štetje ličink je iz 3 mm debelih akrilnih ploščic, in sicer:
 - (i) dno posode mora znašati 180 × 40 mm, razdeljeno v kvadrate;
 - (ii) daljše stranice morajo biti 230 x 20 mm;
 - (iii) krajše stranice morajo biti 40 x 20 mm. Dno in krajše stranice morajo biti vstavljene med daljše stranice tako, da tvorijo posodo z dvema ročicama na obeh koncih. Zgornji del dna se mora dvigniti za 7 do 9 mm od dna ogrodja, ki ga tvorijo daljše in krajše stranice. Deli naj bodo zlepljeni z lepilom, ki je za ta material primerno.
- več petrijevk s premerom 9 cm (pri uporabi stereomikroskopa), katerih spodnja stran se s koničastim orodjem označi v kvadratna preiskovalna polja po 10 x 10 mm,
- aluminijasta folija,
- 25 % klorovodikova kislina,
- pepsin z močjo: 1:10 000 NF (US National Formulary),
kar ustreza 1:12 500 BP (British Pharmacopoea),
kar ustreza 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie),
- tekoča voda, ki se segreje od 46 do 48 °C,
- več 10 litrskih posod za smeti, ki so potrebne pri dekontaminaciji, npr. pri obdelavi priprave s formalinom, in za odvečno digestivno tekočino v primeru pozitivnih rezultatov,
- tehtnica z natančnostjo 0,1 g.

(b) **Odvzem vzorcev**

1. Pri celih trupih je treba iz preponskega stebra pri prehodu v mišični del vzeti približno 2 g vzorec. Če ni preponskih stebrov, se enak vzorec vzame iz rebrnega dela ali prsničnega dela prepone, iz jezične ali čeljustne mišice oziroma iz trebušne muskulature.
2. Od vsakega kosa mesa se vzame približno 2 g vzorec skeletne mišice z malo maščobe in, če je mogoče, v bližini kosti ali kit.

(c) **Metoda**

1. (i) *Popolni skupki (100 vzorcev hkrati)*
 - 100 vzorcev po približno 1 g, vzeti od posameznih vzorcev v skladu z (b), se seseklja v mešalcu Moulinette. Mešalec se vključi tri- do štirikrat, tako da vsakič deluje približno po eno sekundo.
 - Seseklano meso se prenese v trilitrsko čašo in poškopri z 10 g pepsina. Dva litra tekoče vode, ki je bila predhodno segreta na 46 to 48 °C, se vlije v čašo skupaj s 16 ml klorovodikove kisline.
 - Mletje iz mešalca Moulinette se večkrat potopi v digestivno tekočino v čašo, da odpade vse meso, ki se še drži.
 - Mešalna paličica se vstavi v čašo, čaša pa se pokrije z aluminijasto folijo.

- Čaša se postavi na grelno ploščo magnetnega mešalca, ki je bila predhodno segreta, in postopek mešanja se začne. Pred začetkom postopka mešanja je treba magnetni mešalec nastaviti tako, da med delovanjem vzdržuje stalno temperaturo od 44 do 46 °C. Med postopkom mešanja naj digestivna tekočina kroži zadosti hitro, da ustvari globok vrtinec brez brizganja.
- Digestivna tekočina se meša 30 minut, po koncu pa se mešalec izklopi in digestivna tekočina se skozi sito vlije v sedimentacijski lijak.
- Digestivna tekočina se pusti stati v lijaku 30 minut.
- Po 30 minutah se 40 ml vzorec digestivne tekočine hitro odplakne v merilni valj ali centrifugalno cevko.
- 40 ml vzorec se pusti stati 10 minut, nakar se 30 ml supernatanta (bistra tekočina) odvzame s pipetiranjem, ostane pa nam prostornina 10 ml.
- Preostalih 10 ml vzorca sedimenta se vlije v posodo za štetje ličink ali petrijevko.
- Nato se merilni valj ali centrifugalna epruveta izplakne z 10 ml tekoče vode, to pa se doda k vzorcu v posodi za štetje ličink ali petrijevki. Vzorec se preuči s trihinoskopom oziroma stereomikroskopom.
- Pripravek se mora pregledati takoj, ko je pripravljen. V nobenem primeru se pregled ne sme prestaviti na naslednji dan.

Če vzorci niso bili pregledani v 30 minutah po njihovi pripravi, se razbistrijo na naslednji način. Končni vzorec približno 40 ml se vlije v merilni valj in pusti stati vsaj 10 minut, nakar se 30 ml supernatanta (bistra tekočina) odvzame, tako da ostane prostornina 10 ml. To se dopolni s tekočo vodo do prostornine 40 ml. Po nadaljnjem usedanju 10 minut se 30 ml supernatanta (bistre tekočine) odvzame s pipetiranjem, preostalih 10 ml za pregled pa se vlije v petrijevko ali posodo za štetje ličink. Merilni valj se izplakne z 10 ml tekoče vode, to pa se doda k vzorcu v petrijevki ali posodi za štetje ličink, ki je pripravljen za pregled.

Če je sediment pri pregledu moten, se vzorec vlije v merilni valj in dopolni s tekočo vodo do 40 ml, nato pa se ravna v skladu z zgornjim postopkom.

(ii) *Skupki manj kot 100 vzorcev*

Če je potrebno, se lahko skupku 100 vzorcev doda 15 vzorcev po 1 g, ki se pregledajo skupaj s temi vzorci v skladu s (c)(1)(i). V primeru več kot 15 vzorcev se ti pregledajo kot popoln skupek. Pri skupkih do 50 vzorcev se lahko količino digestivne tekočine zmanjša na en liter.

2. V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata po pregledu zbirnega vzorca se od vsakega prašiča vzame nadaljnjih 20 g vzorca v skladu z zgornjo točko (b). Vzorci po 20 g, vzeti od petih prašičev, se združijo in pregledajo po zgoraj opisani metodi. Na ta način bodo pregledani vzorci 20 skupin po pet prašičev. Če se v zbirnem vzorcu, vzetem od petih prašičev, odkrije prisotnost trihinel, se od posameznih prašičev iz skupine odvzame nadaljnjih 20 g vzorcev, pri čemer se vsakega pregleda po zgoraj opisani metodi.“

B. Odstavek 1 poglavja I Priloge II se spremeni:

1. Besedilo v točki (b) se nadomesti z:

„(b) primerno opremljen prostor za preiskave, ki se lahko zaklene in se lahko med preiskavo s trihinoskopom zatemni;“

2. Točka (f) se črta; točke (g), (h), (i), (j), (k), (l), (m) in (n) v tem vrstnem redu postanejo točke (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l) in (m).

3. Besedilo nove točke (g) se nadomesti z:

„(g) umivalnica za čiščenje in dezinfekcijo opreme za preiskave (npr. pladnjev za vzorce, stiskalk, nožev in škarij):

- z voodpornim podom, ki ne gnije in se z lahkoto čisti in dezinficira,
- z gladkimi zidovi, ki so do višine 2 m prevlečeni z rahlo obarvano pralno plastjo ali barvo.

Te določbe ni treba uporabljati za metode iz točk II, III, IV, V, VI Priloge I, če so laboratoriji opremljeni z velikim, ustrezno nameščenim odtokom.“
