

На основу члана 58а став 3. и члана 102. став 8. Закона о ветеринарству („Службени гласник РС”, бр. 91/05, 30/10, 93/12 и 17/19 – др. закон) и члана 17. став 4. и члана 24. став 2. Закона о Влади („Службени гласник РС”, бр. 55/05, 71/05 – исправка, 101/07, 65/08, 16/11, 68/12 – УС, 72/12, 7/14 – УС, 44/14 и 30/18 – др. закон),

Министар пољопривреде, шумарства и водопривреде доноси

## ПРАВИЛНИК

### о начину вршења службене контроле животиња пре и после њиховог клања на присуство трихинеле у месу

"Службени гласник РС", број 48 од 15. априла 2022.

#### Члан 1.

Овим правилником ближе се прописују начин и услови за добијање здравственог статуса у односу на трихинелу, као и начин вршења службене контроле животиња пре и после њиховог клања на присуство трихинеле у месу.

#### Члан 2.

Поједини изрази употребљени у овом правилнику имају следеће значење:

- 1) *контролисани услови држања* јесу услови који се односе на тип узгоја свиња, у коме се свиње све време држе у условима које субјект у пословању храном контролише у погледу храњења и смештаја;
- 2) *мониторинг* јесте спровођење низа планираних активности које се односе на праћење или мерење, како би се добио увид у правилну примену прописа о храни, храни за животиње и здрављу животиња и обухвата учесталост испитивања, број животиња које се испитују и план узорковања;
- 3) *субјект у пословању храном* јесте држалац, односно власник животиња на газдинству на којем се држе и узгајају животиње намењене за клање и производњу меса;
- 4) *Трихинеле (Trichinella)* јесу све нематодне које припадају врстама рода трихинела.

#### Члан 3.

Министарство надлежно за послове ветеринарства (у даљем тексту: Министарство), у складу са законом, може службено доделити здравствени статус „слободно од трихинеле” (у даљем тексту: статус „слободно од трихинеле”) газдинству или компартменту на којем се примењују контролисани услови држања, ако субјект у пословању храном:

- 1) предузме све практичне мере предострожности у погледу изградње и одржавања објекта, како би се спречио приступ глодарима и другим врстама сисара, као и великим птицама месождерима у објекте у којима се држе животиње;
- 2) примењује сопствени програм за контролу штеточина, посебно глодара, на ефективан начин, како би се спречила инвазија свиња, као и води податке о спровођењу тог програма према захтевима надлежног органа;
- 3) обезбеди да се сва храна за животиње допрема из регистрованих или одобрених објеката који производе храну за животиње у складу са одредбама посебног прописа о условима хигијене хране за животиње;
- 4) чува храну за животиње која је намењена врстама животиња прејемчивим на трихинелозу у затвореним силосима или другим посудама у које не могу да продру глодари. Сва остала храна за животиње којом се субјект у пословању храном снабдева обрађује се топлотом или се производи и складишти у складу са одредбама посебног прописа о условима хигијене хране за животиње;
- 5) обезбеди да се угинуле животиње сакупе што је пре могуће, а најкасније у року од 24 сата од угинућа животиње и до нешкодљивог уклањања држе у одговарајућим условима у складу са посебним прописом којим се уређују споредни производи животињског порекла. Угинула прасад могу да се сакупе и до уклањања чувају на газдинству у одговарајућим затвореним контејнерима;
- 6) обавести Министарство ако се у близини газдинства налази депонија за сакупљање комуналног отпада, ради процене ризика;
- 7) обезбеди да су прасад и набављене свиње, који се допремају на газдинство, оплођени и узгајани у контролисаним условима држања у интегрисаном производном систему;
- 8) обезбеди да су свиње обележене тако да свакој животињи може да се прати порекло до газдинства рођења. Субјект у пословању храном може на газдинство да прими нове животиње само ако: оне долазе са газдинстава које има статус „слободно од трихинеле”, или ако их прати међународни сертификат, оверен од стране надлежног органа земље извознице, којим се потврђује да животиње долазе са газдинства које има статус „слободно од трихинеле”, или ако се те животиње држе издвојене, док се не докаже да су резултати

серолошких испитивања, које је одобрила национална референтна лабораторија/референтна лабораторија Европске уније, негативни. Узимање узорака за серолошка испитивање може да почне тек пошто су животиње провеле четири недеље на том газдинству;

9) обезбеди да ниједна свиња намењена клању не излази изван објекта за време трајања целог производног процеса.

#### Члан 4.

Субјект у пословању храном чије је газдинство добило статус „слободно од трихинеле” обавештава Министарство ако услови из члана 3. овог правилника више нису испуњени, односно о другим променама које могу утицати на статус газдинства у односу на присуство трихинеле.

#### Члан 5.

Службена контрола на газдинству које је добило статус „слободно од трихинеле” обавља се периодично на основу процене ризика, узимајући у обзир историју болести и преваленцу, претходне налазе, географско подручје, пријемчивост животиња на трихинелу на том подручју, праксу узгајања животиња, ветеринарски надзор и усаглашеност узгајивача.

У току спровођења службене контроле код домаћих свиња које потичу са газдинства које има статус „слободно од трихинеле”, врши се узорковање у складу са чланом 8. овог правилника.

#### Члан 6.

У току спровођења службене контроле врши се мониторинг популације домаћих свиња које потичу са газдинства или компартмента који има статус „слободно од трихинеле”, како би се проверило стварно одсуство трихинеле код те популације.

Узорци меса узимају се и прегледају на присуство паразита трихинеле, у складу са методама датим у Глави I и II, Прилога 1 – Методе испитивања, који је одштампан уз овај правилник и чини његов саставни део (у даљем тексту: Прилог 1).

Мониторинг може да обухвати и серолошке методе као додатне методе за преглед.

#### Члан 7.

Ако се у току службене контроле утврди да услови из члана 3. овог правилника више нису испуњени, као и у случају позитивног резултата испитивања на трихинелу код домаћих свиња, газдинству се укида статус „слободно од трихинеле”.

У случају позитивног резултата испитивања на трихинелу код домаћих свиња са газдинства које има статус „слободно од трихинеле” предузима се и следеће:

1) прегледају се све домаће свиње са тог газдинства у време клања;

2) проналазе се и испитују све приплодне животиње које су стигле на то газдинство и, ако је то могуће, све животиње које су напустиле газдинство у периоду од шест месеци пре позитивног резултата. У ту сврху, узорци меса прикупљају се и испитују на присуство трихинеле користећи методе детекције из Главе I и II, Прилога 1. овог правилника;

3) испитује се ширење заразе паразитом трихинеле услед дистрибуције меса домаћих свиња закланих у периоду пре позитивног резултата, када је то од значаја и у мери у којој је изводљиво;

4) покреће се епидемиолошко испитивање како би се разјаснио узрок заразе, када је то од значаја;

5) ако се ниједан заражени труп не може идентификовати у кланици, предузима се следеће:

(1) повећање величине сваког узорка меса прикупљеног за испитивање са трупова за које постоји сумња да су заражени трихинелом, или

(2) проглашавање трупова неодговарајућим за исхрану људи, и

(3) нешкодљиво уништавање трупова или делова трупа за које постоји сумња да су заражени трихинелом, као и оних који се током испитивања покажу као позитивни.

После укидања статуса „слободно од трихинеле”, газдинство може поново добити статус „слободно од трихинеле” када се утврди да су испуњени услови наведени у члану 3. овог правилника.

Ако је службеном контролом на газдинству или компартменту утврђена неиспуњеност услова из члана 4. овог правилника или позитиван резултат испитивања на присуство трихинеле, то газдинство се изопштава из компартмента, док се поново не утврди испуњеност услова.

#### Члан 8.

Трупови домаћих свиња узоркују се у објектима за клање као део *post mortem* прегледа у зависности од здравственог статуса газдинства.

Сви трупови са газдинства које нема статус „слободно од трихинеле” систематски се испитују на присуство трихинеле.

Сви трупови приплодних крмача и нерастова и/или најмање 10% трупова животиња послатих на клање сваке године, са сваког газдинства које има статус „слободно од трихинеле” испитују се на трихинелу.

Са сваког трупа узима се узорак и испитује на присуство трихинеле у лабораторији овлашћеној у складу са законом, применом једне од следећих метода:

- 1) референтна метода испитивања, која је прописана у Глави I, Прилога 1. овог правилника; или
- 2) еквивалентна метода испитивања, која је прописана у Глави II, Прилога 1. овог правилника.

Трупови коња, дивљих свиња и других врста домаћих или дивљих животиња који су пријемчиви на инфекцију трихинелом, систематски се узоркују у објекту за клање или објектима за расецање дивљачи у оквиру *post mortem* прегледа.

Узорак из става 5. овог члана узима се са сваког трупа и испитује у овлашћеној лабораторији у складу са Прилогом 1. овог правилника и Прилогом 2 – Испитивање меса других врста животиња, који је одштампан уз овај правилник и чини његов саставни део.

У зависности од резултата испитивања на присуство трихинеле и под условом да субјекат у пословању храном гарантује пуну следљивост, трупови домаћих свиња и коња могу да се расеку на највише шест делова у објекту за клање или у делу за расецање који се налази у истим просторијама као и делатност клања.

Изузетно од става 7. овог члана, трупови домаћих свиња и коња могу да се расеку у објекту за расецање који се налази уз кланицу или је одвојен од кланице, под условом да:

- 1) поступак буде у складу са законом;
- 2) се труп или његови делови отпремају у само један објекат за расецање као одредиште;
- 3) се објекат за расецање налази на територији Републике Србије;
- 4) се у случају позитивног резултата испитивања, сви делови трупа прогласе небезбедним за исхрану људи.

#### Члан 9.

Трупови и месо незалучене домаће прасади, млађих од пет недеља, не испитују се на присуство трихинеле.

Изузетно од члана 8. ст. 1–3. овог правилника трупови и месо домаћих свиња не испитују се на присуство трихинеле, ако животиње потичу са газдинства или компартмента које има статус „слободно од трихинеле” и ако:

- 1) у последње три године није откривена аутохтона зараза трихинелом код домаћих свиња које се држе на газдинствима која имају статус „слободно од трихинеле”, а у том периоду је вршено стално испитивање у складу са чланом 8. овог правилника; или
- 2) историјски подаци о сталном испитивању које је вршено над популацијом закланих свиња дају најмање 95% сигурности да преваленца трихинеле није већа од један од милион у датој популацији.

Испитивање меса свиња трихиноскопским прегледом/методом компресије у складу са Главом III, Прилога 1 овог правилника, врши се само код одступања која се односе на мале субјекте у пословању храном животињског порекла у складу са посебним прописом.

#### Члан 10.

Трупови из члана 8. овог правилника или њихови делови, осим трупова из члана 8. став 8. овог правилника, могу да напусте објекат тек када се утврди да је резултат испитивања на присуство трихинеле негативан.

Други делови животиње намењени за исхрану људи или животиња, који садрже ткиво попречно-пругастих мишића, могу да напусте објекат тек када се утврди да је резултат испитивања на присуство трихинеле негативан.

Споредни производи животињског порекла који нису намењени за употребу код људи и који не садрже ткиво попречно-пругастих мишића, могу да напусте објекат пре него што се утврди да је резултат испитивања на трихинелу негативан.

У случају из става 3. овог члана може да се изврши испитивање на присуство трихинеле или претходни третман споредних производа животињског порекла, пре него што се дозволи да ови производи напусте објекат.

Ако у објектима за клање постоји одобрена процедура којом се обезбеђује да сви делови прегледаних трупова могу да напусте објекат тек када се утврди да је резултат испитивања на присуство трихинеле негативан, односно у случају из члана 8. став 8. овог правилника, ознака здравствене исправности уређена прописом којим се уређује начин и поступак вршења службене контроле хране животињског порекла и начин

вршења службене контроле животиња пре или после клања, може се употребити пре него што су познати резултати испитивања на трихинелу.

#### Члан 11.

Методe лабораторијског испитивања прописане Главом I и II, Прилога 1. овог правилника, користе се за испитивање узорака наведених у члану 8. овог правилника, у службеној лабораторији која је акредитована у складу са важећим стандаром ISO/IEC 17025.

Изузетно од става 1. овог члана испитивање меса на присуство трихинеле, може да се обавља у ветеринарским амбулантама, ветеринарским станицама и ветеринарским клиникама и објектима за клање, ако су испуњени следећи услови:

- 1) да је једина активност лабораторије испитивање меса на присуство трихинеле;
- 2) поседује стручност, опрему и инфраструктуру потребну за откривање присуства *Trichinella* spp. у месу;
- 3) располаже квалификованим, оспособљеним и искусним особљем које редовно учествује у међулабораторијском испитивању и има задовољавајуће резултате у упоредним испитивањима или проверама квалитета рада које организује национална референтна лабораторија за методе које се употребљавају за откривање *Trichinella* spp. у месу.

Сви позитивни узорци шаљу се у референтну лабораторију да би се утврдила типизација врсте трихинеле у узорку који је позитиван.

#### Члан 12.

Ако се утврди присуство на *Trichinella* spp. спроводи се:

- 1) утврђивање следљивости заражених трупова и њихових делова који садрже мишићно ткиво;
- 2) нешкодљиво уклањање заражених трупова и њихових делова;
- 3) испитивање извора заразе и евентуалног ширења међу животињама које живе слободно у природи;
- 4) повлачење производа из малопродаје или од потрошача;
- 5) утврђивање врсте трихинеле.

#### Члан 13.

Даном ступања на снагу овог правилника престаје да важи Правилник о мерама за сузбијање трихинелозе животиња („Службени лист СРЈ”, број 20/95) и члан 36. Правилника о начину и поступку спровођења службене контроле хране животињског порекла и начину вршења службене контроле животиња пре и после њиховог клања („Службени гласник РС”, број 99/10).

#### Члан 14.

Овај правилник ступа на снагу осмог дана од дана објављивања у „Службеном гласнику Републике Србије”, осим одредаба које се односе на статус „слободно од трихинеле” које се примењују од 1. јануара 2023. године.

Број 110-00-00122/2021-09

У Београду, 31. марта 2022. године

Министар,

**Бранислав Недимовић**, с.р.

Прилог 1

## МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА

### ГЛАВА I РЕФЕРЕНТНА МЕТОДА ИСПИТИВАЊА

#### **Вештачка дигестија збирних узорака помоћу магнетске мешалице**

1. Опрема, прибор и хемикалије:

(а) нож или маказе (криве) и пинцета за сечење узорака;

(б) тацне (посуде) подељене на 50 одвојених квадратних преграда од којих у сваку може да се стави најмање 2 г меса, или друга опрема која у потпуности осигурава појединачно узимање и следљивост узорака;

(в) уређај за уситњавање меса/сецкалица за месо са оштрим сечивом. Ако су узорци већи од 3 g, мора да се користи уређај за млевење меса са промером отвора решетке/плоче од 2 до 4 mm или маказе. Узорак замрзнутог меса или језика (после уклањања површинског везивно-ткивног слоја, који не може да се дигестује/свари), уситњава се у уређају за млевење меса, а величина узорка мора сразмерно да се повећа;

(г) магнетне мешалице са термостатски контролисаном плочом за загревање и магнетним штапићима за мешање пресвученим тефлоном, дужине око 5 cm;

(д) конусни стаклени левкови за одвајање (седиментацију/сепарацију/таложeње), капацитета најмање 2 l, пожељно је да је са уграђеним тефлонским сигурносним вентилом/затварачем/славином;

(ђ) сталкови (стони, метални), прстенови (држачи левка) и штапаљке;

(е) сита спољашњег промера/пречника 11 cm, са мрежицом од нерђајућег челика чији су отвори промера 180 μm (микрона);

(ж) левкови унутрашњег промера/пречника не мањег од 12 cm, за постављање сита;

(з) стаклена посуда (чаша) капацитета 3 l;

(и) стаклени мерни цилиндри (мензуре) капацитета 50 до 100 ml или кивете за центрифугирање;

(ј) трихиноскоп са хоризонталном плочом/сталком или стереомикроскоп са сопственим извором светлости чији интензитет може да се подешава;

(к) Петријеве шоље пречника 9 cm (употребљавају се са стереомикроскопом) означене мрежом квадратних поља величине 10 × 10 mm са спољашње стране дна;

(л) посуда/корито/базен за бројање ларви (употребљава се са трихиноскопом), израђена од акрилних (плексиглас) плоча дебљине 3 mm, следеће конструкције:

– дно посуде (корита) је величине 180 × 40 mm и исцртано је на квадрате величине 10 × 10 mm,

– странице су величине 230 × 20 mm,

– крајеви (ручке) су величине 40 × 20 mm. Дно и крајеви морају да се уметну између страница, тако да се на крајевима формирају две ручке. Горња ивица страница мора да буде издигнута 7 до 9 mm изнад базе оквира кога чине странице и крајеви. Сви делови морају да се споје лепком који одговара за лепљење употребљеног материјала;

(љ) алуминијумска фолија;

(м) 25% хлороводонична киселина;

(н) пепсин јачине 1:10 000 NF (US National Formulary), што одговара 1:12 500 BP (British Pharmacopoeia) и 1:2 000 FIP (Federation Internationale de Pharmacie) или стабилизирајући пепсин са најмање 660 јединица европске фармакопеје/ml;

(њ) вода из славине/за пиће загрејана на 46–48 °C;

(о) вага са највећим дозвољеним одступањем од 0,1 g;

(п) металне посуде капацитета 10 до 15 литара за сакупљање остатка дигестивне течности;

(р) пипете различите запремине/величине (1, 10 и 25 ml) и држачи пипета;

(с) термометар са мерним опсегом од 1–100 °C, са тачношћу од 0,5 °C;

(т) сифон/одвод за воду из славине.

2. Прикупљање и количина узорака за дигестију:

(а) у случају узорковања трупова домаћих свиња, узорак узет са корена дијафрагме, на прелазу мишићног у тетивасти део, мора да има тежину најмање 1 g. Могу да се користе и посебна кљешта (форцепс) да би се обезбедила тачност од 1,00 до 1,15 g узетог узорка.

У случају приплодних крмача и нерастова, мора да се узме већи узорак корена дијафрагме, на прелазу мишићног у тетивасти део, тежине најмање 2 g.

У недостатку корена дијафрагме, мора да се узме двоструко тежи узорак, односно 2 g (или 4 g у случају приплодних крмача и нерастова), са ребарног или грудног дела дијафрагме или са жвакаћих мишића, језика или трбушних мишића;

(б) за месо расечено у комаде, мора да се узме узорак тежине најмање 5 g попречно-пругастих мишића са што мање масног ткива, по могућности што ближе кости или фасцији. Узорак исте величине се узима од меса које није намењено кувању или било ком другом начину прераде;

(в) Од замрзнутог меса, за испитивање мора да се узме најмање 5 g попречно-пругастих мишићног ткива.

Тежина узорака за испитивање односи се узорак меса без масног и везивног ткива.

Посебну пажњу потребно је обратити при узимању узорка мишићног ткива језика, како би се избегла контаминација површинским слојем језика, који не може да се дигестује/свари и може да спречи/отежа видљивост/прозирност и испитивање седимента.

### 3. Поступак рада

#### 3.1. Потпуни збирни узорак (у укупној количини од 100 g за истовремену дигестију)

(а)  $16 \pm 0,5$  ml хлороводоничне киселине додаје се у стаклену посуду од 3 l у којој се налази 2 l претходно загрејане воде из славине на  $46-48$  °C; магнетни штапић се спушта на дно посуде, која се ставља на већ загрејану магнетну мешалицу и укључује мешање помоћу магнета;

(б) мешавини воде и киселине додаје се  $10 \pm 0.2$  g пепсина или  $30 \pm 0.5$  g течног пепсина;

(в) 100 g мишићног ткива прикупљеног у складу са одељком 2. ове главе, сецка се у уређају за уситњавање;

(г) уситњено месо се преноси/ставља у стаклену посуду од 3 l која садржи воду, пепсин и хлороводоничну киселину;

(д) нож уређаја за уситњавање више пута се урања у посуду са дигестивном течношћу, а посуду у којој се месо уситњавало, испира се малом количином дигестивне течности, како би се уклонили сви остаци меса који су на зиду посуде уређаја за уситњавање;

(ђ) посуду се прекрива алуминијумском фолијом;

(е) магнетна мешалица мора да се подеси тако да одржава сталну температуру од  $44-46$  °C и ротацију магнета на довољно великој брзини да се створи дубоки вртлог, да се притом течност не прелива или прска из посуде;

(ж) дигестивна течност се меша и траје све док се комадићи меса не разграде (око 30 минута). Мешалица се тада искључи и дигестивна течност се сипа кроз сито у левак за одвајање (седиментацију). Дуже време дигестије може да буде потребно (не преко 60 минута) када се дигестује/сваре одређени делови мишићног ткива (језик, мишићно ткиво дивљачи итд.);

(з) ефекат дигестије сматра се задовољавајућим, ако на сити заостане највише 5% остатка ткива од почетне количине збирног узорка;

(и) дозвољено је да дигестивна течност стоји у левку 30 минута;

(ј) после 30 минута, узорак од 40 ml седимента дигестивне течности нагло се одлије у мензурну или кивету за центрифугирање;

(к) дигестивна течност и друге отпадне течности, чувају се у посебним посудама до читавања резултата испитивања;

(л) 40 ml седимента/узорка у мензури/кивети остави се да стоји 10 минута, а затим се 30 ml површинског слоја течности пажљиво одстрани усисавањем, тако да у мензури/кивети остане запремина од највише 10 ml;

(љ) остатак седимента од 10 ml излије се у посуду (корито) за бројање ларви или у Петријеву шољу;

(м) мензура или кивета за центрифугирање испира се са не више од 10 ml воде из славине и додаје узорку у посуду (корито) за бројање ларви или Петријевој шољи. Затим, узорак се прегледа трихиноскопом или стереомикроскопом при увећању од 15–20 пута. Дозвољена је детекција ларви употребом других техника или оптичких уређаја, под условом да је испитивање позитивних контролних узорака дало једнаке или боље резултате од традиционалних метода визуелног прегледа. У свим случајевима сумњивих поља или појаве паразитима – сличних облика, мора да се користи веће увећање – од 60 до 100 пута;

(н) седименти дигестивне течности морају да се прегледају чим су припремљени. Преглед ни под каквим околностима не сме да се одложи за следећи дан.

Ако седимент није прегледан у року од 30 минута од испуштања у мензурну или кивету за центрифугирање, мора да се избистри на следећи начин: завршни узорак од 40 ml седимента излије се у мензурну или кивету и остави да стоји 10 минута. Затим се површински слој течности од 30 ml пажљиво одстрани усисавањем, тако да остане количина од 10 ml, која се допуни са 30 ml воде из славине до укупне количине/запремине од 40 ml. После даљег/поновног таложења у трајању од 10 минута, 30 ml површинског слоја течности пажљиво се одстрани усисавањем, тако да остане количина од 10 ml седимента за испитивање у Петријевој шољи или у посуду (кориту) за бројање ларви. Мензура или кивета испира се са не више од 10 ml воде из славине и испирак се додаје узорку, који се налази у Петријевој шољи или посуду (кориту) за бројање ларви за испитивање.

Ако се при испитивању утврди да седимент није бистар, узорак мора да се сипа у мензурну или кивету и дода се 40 ml воде из славине и понавља се претходно описани поступак. Овај поступак може да се понови 2–4 пута, док течност не буде довољно бистра за поуздано читање резултата.

#### 3.2. Збирни узорак мањи од 100 g

Ако је потребно, збирном узорку од 100 g може да се дода до 15 g и испита заједно са тим узорцима у складу са пододељком 3.1. овог одељка.

Ако је узорак већи од 15 g, мора да се прегледа као засебан збирни узорак.

За збирне узорке до 50 g, дигестивна течност и остали састојци могу да се смање на 1 литар воде, 8 ml хлороводоничне киселине и 5 g пепсина.

### 3.3. Позитивни или сумњиви/непоуздани резултати

Када је резултат испитивања збирног узорка позитиван или сумњив/непоуздан, узима се нови узорак од 20 g од сваке свиње у складу са одељком 2. тачка (а) ове главе.

Узорци од пет свиња по 20 g испитују се као збирни узорак према поступку у складу са пододељком 3.1. овог одељка. На овај начин биће испитани узорци од 20 група по пет свиња.

Када је утврђена *Trichinella* у једном збирном узорку од пет свиња, узима се додатних 20 g узорка од сваке свиње из те групе и сваки од њих се прегледа посебно према поступку у складу са пододељком 3.1 и 3.2 овог одељка.

Узорци са паразитима чувају се у 90 % етил-алкохолу у циљу конзервације и идентификације врсте у референтној лабораторији Европске уније или у националној референтној лабораторији.

После сакупљања/утврђивања паразита, течности позитивног узорка (дигестивна течност, површински слој течности, испирци и др.), морају да се деконтаминирају загревањем на најмање 60 °C.

### 3.4 Поступак чишћења и деконтаминације након позитивног или сумњивог резултата

Ако се испитивањем збирног или појединачног узорка или појединачног узорка добије позитиван или сумњив резултат, сви материјали у контакту са месом (мешалица и оштрица, посуда, штапић за мешање, сензор температуре, конични левак за филтрацију, сито и пинцете) морају се пажљиво деконтаминирати прањем у топлој води (65 до 90 °C). Ако се при прању употребљава детерџент, препоручује се да се ради његова уклањања сваки део темељно испере.

## ГЛАВА II ЕКВИВАЛЕНТНЕ МЕТОДЕ

### А. МЕТОДА ПОМОЋУ МЕХАНИЧКЕ ДИГЕСТИЈЕ ЗБИРНОГ УЗОРКА – ТЕХНИКА СЕДИМЕНТАЦИЈЕ –

#### 1. Опрема, прибор и хемикалије:

(а) нож или маказе за сечење узорака;

(б) тацне (посуде) подељене на 50 одвојених квадратних преграда од којих у сваку може да се стави најмање 2 g меса, или друга опрема која у потпуности осигурава појединачно узимање и следљивост узорака;

(в) уређај за млевење меса или електрични уређај за уситњавање меса/сецкалица за месо;

(г) мешалица типа Stomacher lab-blender 3500 термо модел;

(д) пластичне кесе, одговарајуће за Stomacher lab-blender;

(ђ) конусни стаклени левкови за одвајање (седиментацију/сепарацију/таложeње), капацитета најмање 2 l, пожељно је да је са уграђеним тефлонским сигурносним вентилом/затварачем;

(е) сталкови (стони, метални), прстенови (држачи левка) и штисаљке (фиксирани на стативу помоћу двоструког наглавка са хваталкама – 23 x 40 mm);

(ж) сита спољашњег промера/пречника 11 cm, са мрежицом од нерђајућег челика или месинга чији су отвори промера 180 µm (микрона);

(з) левкови унутрашњег пречника не мањег од 12 cm, за постављање сита;

(и) стаклени мерни цилиндри (мензуре) од 100 ml;

(ј) термометар са мерним опсегом од 1–100°C, са тачношћу од 0,5 °C;

(к) уређај за вибрирање, нпр. електрични апарат за бријање (без наставака);

(л) склопка која се укључује и искључује у размацама/интервалима од један минут;

(љ) трихиноскоп са хоризонталном плочом/сталком или стереомикроскоп са сопственим извором светлости чији интензитет може да се подешава;

(м) посуда/корито/базен за бројање ларви и већи број Петријевих шоља пречника 9 cm, као у Глави I, одељак 1. тачка (к) и (л) овог прилога;

(н) 17,5 % хлороводонична киселина;

(њ) пепсин јачине 1:10 000 NF (US National Formulary), што одговара 1:12 500 BP (British Pharmacopoea) и 1:2 000 FIP (Federation Internationale de Pharmacie) или стабилизирајући пепсин са најмање 660 јединица европске фармакопеје/ml;

(о) већи број посуда од 10 литара за деконтаминацију апаратуре, нпр. формалин, као и за преосталу дигестивну течност после дигестије позитивних узорака;

(п) вага са највећим дозвољеним одступањем од 0,1 г.

## 2. Сакупљање узорака за дигестију

Узорци за дигестију сакупљају се на начин утврђен у Глави I, одељак 2. овог прилога.

## 3. Поступак

### 3.1. Уситњавање/Млевење

Ако се узорци меса претходно уситне у уређају за млевење меса, побољшава се квалитет дигестије. Када се користи, електрична сецкалица се укључује три до четири пута у трајању од једне секунде.

### 3.2. Поступак дигестије

Поступак може да се спроводи на потпуним збирним узорцима од 100 г меса (у укупној количини од 100 г за истовремену дигестију), или на збирним узорцима мањим од 100 г.

(а) Потпуни збирни узорак (100 г од 100 узорака за истовремену дигестију)

– на уређај Stomacher lab-blender 3500 ставља се двострука пластична кеса. Температура се подешава на 40 до 41 °С;

– у унутрашњу пластичну кесу налије се 1.5 литар претходно загрејане воде на 40 до 41 °С;

– 25 ml 17,5 % хлороводоничне киселине додаје се води у пластичној кеси;

– томе се дода 100 узорака, сваки тежине око 1 г (на температури од 25 до 30 °С), узетих на начин који је описан у одељку 2. овог дела;

– на крају, додаје се 6 г пепсина. Овај редослед мора строго да се поштује да би се избегла разградња пепсина;

– затим, Stomacher „меша” садржај кесе у току 25 минута;

– пластична кеса се вади из Stomachera и дигестивна течност се филтрира кроз сито у лабораторијску чашу од 3 l;

– пластична кеса се испира са око 100 ml воде. Испирком се даље испира сито и на крају додаје филтрату у лабораторијској чаши;

– збирном узорку од 100 појединачних узорака може да се дода до 15 појединачних узорака и испита заједно са тим узорцима.

(б) Мањи збирни узорци (мањи од 100 узорака)

– на уређај Stomacher lab-blender 3500 ставља се двострука пластична кеса. Температура се подешава на 40 °С до 41 °С;

– дигестивна течност се припрема мешањем око 1.5 литар воде и 25 ml 17,5% хлороводоничне киселине. Томе се додаје 6 г пепсина и све се меша при температури од 40 °С до 41 °С. Овај редослед мора строго да се поштује, како би се избегла разградња пепсина;

– од дигестивне течности одмерава се количина која одговара односу од 15 ml по граму узорка (нпр. за 30 узорака захтевана запремина је 30 x 15 ml = 450 ml). Дигестивна течност се ставља у унутрашњу од две пластичне кесе заједно са узорцима меса од 1 г (при температури од 25 до 30 °С) сакупљеним у складу са одељком 2. овог дела;

– у спољашњу кесу налива се вода загрејана на око 41 °С, тако да укупна запремина обе кесе износи 1.5 литар. У Stomacheru се садржај кесе „меша” у току 25 минута;

– пластична кеса се извади из Stomacher уређаја. Дигестовани/сварени садржај се филтрира кроз сито у лабораторијску чашу од 3 l;

– пластична кеса се испира са око 100 ml воде (при 25 до 30 °С), која се касније користи и за испирање сита и додаје филтрату у лабораторијској чаши.

### 3.3. Сакупљање ларви седиментацијом

– Дигестованом свареном садржају додаје се лед (300 до 400 г леда у листићима или дробљеног леда), тако да се запремина повећа на око 2 l. Сварени садржај се меша док се лед не отопи. У случају мањих збирних узорака (видети пододељак 3.2 тачку (б) овог одељка), количина леда се пропорционално смањује;

– охлађени сварени садржај се сипа у конусни стаклени левак за одвајање (сепаратор) запремине 2 l, који је опремљен уређајем за вибрирање (трешење) на додатној штипаљки;

– седиментација/таложјење траје 30 минута и то са прекидима, тј. смењују се један минут вибрирања и један минут мировања;



- после 30 минута, 60 ml седимента брзо се одлије у мензуром од 100 ml (после употребе, мензура се испере раствором детерџента);
- 60 ml седимента остави се да стоји 10 минута, а затим се површински слој течности пажљиво одстрани усисавањем, тако да остане запремина од 15 ml, која ће се испитати на присуство ларви;
- за усисавање може да се употреби и бризгалица („шприц“) за једнократну употребу, опремљена пластичном цевчицом. Дужина цевчице мора бити толика, да када се „крилица“ бризгалице поставе на ивицу, у мензури остане 15 ml течности/седимента;
- преосталих 15 ml сипа се у посуду за бројање ларви или у две Петријеве шоље и испитује на трихиноскопу или на стереомикроскопу;
- Мензура се испира са 5 до 10 ml воде из славине. Добијени испирак додаје се узорку за испитивање;
- седимент мора да се испита одмах после припреме.

Преглед ни под каквим околностима не сме да се одложи за следећи дан.

Ако седимент није бистар, или се не испита у року од 30 минута, потребно га је избистрити на следећи начин:

- укупна количина седимента од око 60 ml сипа се у мензуром и остави да одстоји 10 минута,
  - затим се усисавањем уклања 45 ml горњег слоја течности,
  - преосталих 15 ml течности допуни се са 45 ml воде из славине,
  - после даље седиментације у току 10 минута, опет се усиса горњи слој течности (око 30 ml).
- Преосталих 15 ml, који се користе за испитивање, сипају се у Петријеву шољу или у посуду за бројање ларви,
- мензура се испира са 10 ml воде из славине. Испирак се додаје узорку у Петријевој шољи или у посуду за бројање ларви за испитивање.

#### 3.4. Позитивни или сумњиви/непоуздани резултати испитивања

У случају позитивног или сумњивог/непоузданог резултата испитивања, примењују се одредбе утврђене у Глави I, одељак 3, пододељак 3.3. овог прилога.

### Б. МЕТОДА ПОМОЋУ МЕХАНИЧКЕ ВЕШТАЧКЕ ДИГЕСТИЈЕ ЗБИРНОГ УЗОРКА – ТЕХНИКА „ИЗДВАЈАЊА НА ФИЛТЕРУ“ –

#### 1. Опрема, прибор и хемикалије:

Опрема, прибор и хемикалије користе се како је наведено у делу А, одељак 1. ове главе.

Додатна опрема:

- (а) Гелманов сепаратор запремине 1 литар, опремљен држачем за филтер (промер/пречник 45 mm);
- (б) филтерске плоче које се састоје од округле мреже израђене од нерђајућег челика са порама/отворима од 35  $\mu$ m (промер плоче: 45 mm), два гумена прстена дебљине 1 mm (промер спољашњег прстена: 45 mm; промер унутрашњег прстена: 38 mm), с тим да се округла мрежа поставља између два гумена прстена и за њих причвршћује двокомпонентним лепком одговарајућим за лепљење оба материјала;
- (в) Ерленмајер посуда запремине 3 l, опремљена бочном цевчицом за усисавање;
- (г) филтерска пумпа;
- (д) пластичне кесе, запремине од најмање 80 ml;
- (ђ) уређај за заваривање/пломбирање пластичних кеса;
- (е) ренилаза јачине 1:150 000 Sokslet јединица по граму.

#### 2. Сакупљање узорака

Узорци се сакупљају како је наведено у Глави I, одељак 2. овог прилога.

#### 3. Поступак

##### 3.1. Млевење

Ако се узорци меса претходно уситне у уређају за млевење меса, побољшава се квалитет дигестије. Када се користи, електрична сецкалица се укључује три до четири пута у трајању од једне секунде.

##### 3.2. Поступак дигестије

Овај поступак може да се спроводи на потпуним збирним узорцима (у укупној количини од 100 g за истовремену дигестију), или на збирним узорцима мањим од 100 g.

- (а) Потпуни збирни узорак (истовремено 100 узорака)

Примењује се поступак у делу А, одељак 3, пододељак 3.2, тачка (а) ове главе;

(б) Мањи збирни узорци (мање од 100 појединачних узорака)

Примењује се поступак у делу А, одељак 3, пододељак 3.2, тачка (б) ове главе.

### 3.3. Сакупљање ларви филтрирањем

(а) Дигестованом/свареном садржају се додаје лед (300 до 400 г леда у листићима или дробљеног леда), тако да се запремина повећа на око 2 l. Количина леда се пропорционално смањује када се дигестује/свари мања количина узорака;

(б) дигестовани сварени садржај меша се док се лед не истопи. Расхлађени садржај се оставља најмање три минута, колико је потребно да се ларве склупчају;

(в) Гелманов сепаратор опремљен држачем за филтер и диском, ставља се на Ерленмајер посуду која је повезана са филтерском пумпом;

(г) дигестовани/сварени садржај сипа се у Гелманов сепаратор и филтрира. Пред крај филтрације, пролаз течности кроз филтер може се помогне усисавањем помоћу филтерске пумпе. Усисавање мора да се прекине пре него што филтер постане сув, односно када у сепаратору остане 2 до 5 ml течности;

(д) када се сва течност профилира, диск са филтером се скида и ставља у пластичну кесу запремине 80 ml заједно са 15 до 20 ml раствора ренилазе. Раствор ренилазе се припрема мешањем 2 г ренилазе у 100 ml воде из славине;

(ђ) пластична кеса се два пута заварује/пломбира и поставља између унутрашње и спољашње кесе Stomachera;

(е) Stomacher се укључује и оставља да ради 3 минута (нпр. док ради на потпуном или непотпуном узорку);

(ж) после три минута, пластична кеса се заједно са диском са филтером и раствором ренилазе вади из Stomacher уређаја и отвара маказама. Течни садржај се одлије у посуду за бројање ларви или у Петријеву шољу. Кеса се испира са 5 до 10 ml воде. Испирак се додаје у посуду за бројање ларви. Испитује се помоћу трихиноскопа, или стереомикроскопа;

(з) дигестивна течност мора да се испита одмах након припреме. Ни у ком случају, испитивање не сме да се одложи за следећи дан.

*Напомена:* Диск са филтером не сме да се користи ако није потпуно чист. Не сме да се дозволи да се нечисти диск са филтером осуши. Диск са филтером може да се чисти урањањем у раствор ренилазе у току ноћи. Пре употребе, пере се у свежем раствору ренилазе у Stomacheru.

### 3.4. Позитивни или сумњиви/непоуздани резултати испитивања

Када је резултат позитиван или сумњив, примењују се одредбе наведене у Глави I, одељак 3, пододељак 3.3. овог прилога.

## V. МЕТОДА АУТОМАТСКЕ ВЕШТАЧКЕ ДИГЕСТИЈЕ ЗБИРНИХ УЗОРАКА ТЕЖИНЕ ДО 35 g

### 1. Опрема, прибор и хемикалије:

(а) нож или маказе за сечење узорака;

(б) тацне (посуде) подељене на 50 одвојених квадратних преграда од којих у сваку може да се стави најмање 2 г меса, или друга опрема која у потпуности осигурава појединачно узимање и следљивост узорака;

(в) мешалица Trichomatic 35® са уметком за филтрирање;

(г) хлороводонична киселина –  $8,5 \pm 0,5\%$  тежине;

(д) прозирни поликарбонатни мембрански филтери са промером од 50 mm и величином пора/отвора од 14  $\mu\text{m}$ ;

(ђ) пепсин јачине 1:10 000 NF (US National Formulary), што одговара 1:12 500 BP (British Pharmacopoeia) и 1:2 000 FIP (Federation Internationale de Pharmacie) или стабилизирајући пепсин са најмање 660 јединица европске фармакопеје/ml;

(е) вага са највећим дозвољеним одступањем од 0,1 g;

(ж) пинцета са равним врховима;

(з) више микроскопских стакала дужине бочних страница најмање 5 cm или више Петријевих шоља са промером од најмање 6 cm, које су зашиљеним алатом са доње стране исцртане у квадрате површине 10 x 10 mm;

(и) стереомикроскоп (повећање 15 до 60 пута), са сопственим извором светла, или трихиноскоп са хоризонталном плочом/сталком;

(ј) посуда за сакупљање отпадних течности;

(к) већи број посуда од 10 литара за деконтаминацију апаратуре, нпр. формалин, као и за преосталу дигестивну течност после дигестије позитивних узорака;

(л) термометар са опсегом мерења од 1 до 100 °C, са тачношћу од 0,5 °C.

## 2. Сакупљање узорака

Узорци се сакупљају како је наведено у Глави I, одељак 2. овог прилога.

## 3. Поступак

### 3.1. Поступак дигестије

(а) Филтер се поставља се у мешалицу, споји се одводна цев и постави тако да се одлива у посуду за отпад;

(б) када се мешалица укључи, почиње и загревање;

(в) пре тога се отвори и затвори вентил на дну, који је смештен испод реакционе коморе;

(г) затим, додаје се до 35 узорака, од којих је сваки тежак око 1 g (при 25 °C до 30 °C), а који су узети од појединачних узорака у складу са одељком 2. овог дела.

Потребно је проверити да ли су одстрањени већи комади тетива, јер могу да зачепе мембрански филтер.

(д) сипа се вода до ивице коморе за течност која је спојена са мешалицом (око 400 ml);

(ђ) сипа се око 30 ml хлороводоничне киселине (8,5%) до ивице мање, спојене коморе за течност;

(е) постави се мембрански филтер испод грубог филтера у држач улошка филтера,

(ж) на крају, додаје се 7 g пепсина или 21 g течног пепсина. Овај редослед мора строго да се поштује да би се избегла разградња пепсина;

(з) затвори се поклопац реакционе коморе и коморе за течност;

(и) одабере се време трајања дигестије. Кратко време дигестије (5 минута) одређује се за узорке свиња нормалне старости за клање, а за друге узорке, одређује се дуже време (8 минута);

(ј) када се укључи прекидач за почетак рада мешалице, аутоматски почиње поступак припреме и дигестије, после чега следи филтрирање. После 10 до 13 минута, поступак је завршен и аутоматски се прекида;

(к) после провере да ли је комора празна, отвори се поклопац реакционе коморе. Ако је у комори остало пене или било које друге дигестивне течности, потребно је поновити поступак у складу са пододељком 3.5. овог одељка.

### 3.2. Сакупљање ларви

(а) Одстри се држач филтера и пренесе се мембрански филтер на микроскопско стакло или Петријеву шољу;

(б) мембрански филтер се прегледа стереомикроскопом или трихиноскопом.

### 3.3. Чишћење опреме

(а) У случају позитивног резултата испитивања, реакциона комора мешалице се напуни кључалом водом до две трећине своје запремине. Вода из славине се сипа у спојену комору за течност, тако да покрије доњи сензор. Тада почиње аутоматско чишћење.

Деконтаминира се држач филтера и сва друга опрема, нпр. употребом формалина;

(б) На крају радног дана, комора за течност у мешалици се напуни водом и пропусти кроз стандардни циклус рада.

### 3.4. Употреба мембранског филтера

Сваки поликарбонатни мембрански филтер може да се употреби највише пет пута. Филтер након сваке употребе мора да се окрене. Осим тога, после сваке употребе филтер треба да се провери и утврди да нема оштећења због којих би био неприкладан за даљу употребу.

### 3.5. Поступак који се примењује када је дигестија непотпуна и када не може да се изведе филтрирање

Када мешалица прође кроз аутоматски циклус у складу са пододељком 3.1. овог одељка, отвори се поклопац реакционе коморе и провери да ли је у комори остало пене или било какве течности. У том случају, потребно је учинити следеће:

(а) затвори се доњи вентил испод реакционе коморе;

(б) уклони се држач филтера и пренесе мембрански филтер на лабораторијско стакло или у Петријеву шољу;

(в) стави се нови мембрански филтер у држач филтера и причврсти се држач филтера;

(г) комора за течност мешалице напуни се водом, док се не покрије доњи сензор;

(д) изведе се циклус аутоматског чишћења;

(ђ) када је циклус аутоматског чишћења готов, отвори се поклопац реакционе коморе и провери да ли има заостале течности;

(е) ако је комора празна, извади се држач филтера и помоћу пинцете пренесе мембрански филтер на лабораторијско стакло или у Петријеву шољу;

(ж) прегледају се оба мембранска филтера у складу са пододељком 3.2. овог одељка. Ако филтери не могу да се прегледају, понови се цео процес дигестије са дужим временом дигестије у складу са пододељком 3.1. овог одељка.

### 3.6. Позитивни или сумњиви/непоуздани резултати

Када је резултат позитиван или сумњив, примењују се одредбе наведене у Глави I, одељак 3. пододељак 3.3. овог прилога.

## Г. МЕТОДА ПОМОЋУ МЕХАНИЧКЕ ВЕШТАЧКЕ ДИГЕСТИЈЕ – ТЕХНИКА „ИЗДВАЈАЊА НА ФИЛТЕРУ” И ДЕТЕКЦИЈА ЛАРВИ ПОМОЋУ „ЛАТЕКС ТЕСТА АГЛУТИНАЦИЈЕ”

Ова метода се сматра еквивалентном само за испитивање меса домаћих свиња.

### 1. Опрема, прибор и хемикалије:

(а) нож или маказе за сечење узорака;

(б) тацне (посуде) подељене на 50 одвојених квадратних преграда, од којих у сваку може да се стави најмање 2 г меса, или друга опрема која у потпуности осигурава појединачно узимање и следљивост узорака;

(в) уређај за уситњавање меса/сецкалица за месо, са оштрим сечивом. Ако су узорци већи од 3 г, мора да се користи уређај за млевење меса са промером отвора решетке/плоче од 2 до 4 mm, или маказе. Узорак замрзнутог меса или језика (после уклањања површинског везивно-ткивног слоја, који не може да се свари/дигестира), уситњава се у уређају за млевење меса, а величина узорка мора сразмерно да се повећа;

(г) магнетне мешалице са термостатски контролисаном плочом за загревање и магнетним штапићима за мешање пресвученим тефлоном, дужине око 5 cm;

(д) конусни стаклени левкови за одвајање (седиментацију/сепарацију/таложење), капацитета најмање 3 l; пожељно је са уграђеним тефлонским сигурносним вентилом/затварачем/славинам;

(ђ) сита спољашњег промера/пречника 11 cm, са мрежицом од нерђајућег челика чији су отвори промера 180 μm (микрона);

(е) челични филтрациони апарат са мрежастим филтерима величине 20 μm са челичним левком;

(ж) Вакуум пумпа;

(з) метални или пластични резервоари, запремине 10–15 литара, за сакупљање дигестивног сока;

(и) 3Д гираторна клацкалица („3D gyratory rocker”);

(ј) алуминијумска фолија;

(к) 25% хлороводонична киселина;

(м) пепсин јачине 1:10 000 NF (US National Formulary), што одговара 1:12 500 BP (British Pharmacopoea) и 1:2 000 FIP (Federation Internationale de Pharmacie) или стабилизирајући пепсин са најмање 660 јединица европске фармакопеје/ml;

(л) вода из славине/за пиће загрејана на 46–48 °C;

(љ) вага са највећим дозвољеним одступањем од 0,1 g;

(м) пипете различитих величина (1, 10 и 25 ml), микропипете у складу са упутствима произвођача латексне аглутинације и држачи пипета;

(н) најлонски мрежасте филтери пречника 20 микрона који се уклапа у систем за филтрирање;

(њ) пластична или челична форцепс кљешта од 10–15 cm;

(о) конусне бочице од 15 ml;

(п) пиштољ са тефлонским или челичним конусним врхом који може да стане у конусне бочице;

(р) термометар са мерним опсегом од 1–100 °C, са тачношћу од 0,5 °C;

(с) латек аглутинацијске карте у склопу Trichin-L антиген тест кита, валидиране под шифром EURLP\_D\_001/2011;

(т) пуферски раствор са конзервансом (разблаживач узорка) у склопу Trichin-L антиген тест кита, валидиране под шифром EURLP\_D\_001/2011;

(ћ) пуфер са додатком конзерванса (негативна контрола) у склопу Trichin-L антиген тест кита валидиране под шифром EURLP\_D\_001/2011;

(у) пуфер са додатком антигена *Trichinella spiralis* и конзервансом (позитивна контрола) у склопу Trichin-L антиген тест кита, валидиране под шифром EURLP\_D\_001/2011;

(ф) пуфер са полистиренским честицама прекривеним антителима допуњеним конзервансом (латекс куглице) у склопу Trichin-L антиген тест кита, валидиране под шифром EURLP\_D\_001/2011;

(х) штапићи за једнократну употребу.

## 2. Прикупљање и количина узорака

За прикупљање и количину узорка пратити поступак предвиђен у Глави I, одељку 2. овог прилога.

## 3. Поступак рада

### 3.1. Потпуни збирни узорак (100 g од 100 узорака за истовремену аглутинацију)

(а)  $16 \pm 0,5$  ml хлороводоничне киселине додаје се у стаклену посуду од 3 l у којој се налази  $2 l \pm 200$  ml претходно загрејане воде из slavine, на  $46-48^{\circ}\text{C}$ ; магнетни штапић се спушта на дно посуде, која се ставља на већ загрејану магнетну мешалицу и укључује мешање помоћу магнета;

(б) мешавини воде и киселине додаје се  $10 \pm 1$  g пепсина у праху (или  $30 \pm 3$  ml течног пепсина);

(в) 100 до 115 g узорака узетих у складу са одељком 2. овог дела уситњава се у мешалици са 150 ml +/- 15 ml претходно загрејаног дигестивног пуфера;

(г) уситњено месо пребацује се у посуду од 3 l, у којој се налазе вода, пепсин и хлороводонична киселина;

(д) нож уређаја за уситњавање се више пута урања у посуду са дигестивним соком, а посуду у којој се уситњавало месо, испере се малом количином дигестивног сока да би се уклонило све месо које се задржало;

(ђ) посуду се покрије алуминијском фолијом;

(е) магнетна мешалица мора да се подеси тако да током рада одржава сталну температуру од 44 до  $46^{\circ}\text{C}$ . Током мешања, дигестивни сок мора да се ротира довољном брзином да би се створио дубоки вир, тако да не долази до прскања садржаја из посуде;

(ж) дигестивни сок се меша док се делови меса не разграде (око 30 минута). Тада се мешалица искључи, а дигестивни сок излије кроз сито у седиментни левак. Дуже време дигестије (најдуже 60 минута) може бити потребно ако се „варе“ одређене врсте меса (језик, месо дивљачи итд.);

(з) поступак вештачке дигестије сматра се задовољавајућим када на сити не остане више од 5 % почетне тежине узорка;

(и) најлонски филтар са отворима од 20 микрона ставља се на филтрацијску подлогу. Челични конусни левак за филтрацију фиксира се на подлогу системом за блокирање и челично сито са отворима промера 180 микрона ставља се на левак. Вакуумска пумпа спојена је са филтрационом подлогом и са металном или пластичном посудом за скупљање дигестивног сока;

(ј) мешање се зауставља и дигестивни сок се кроз сито излива у левак за филтрацију. Посуда се испира са око 250 ml топле воде. Течност за испирање излива се у посуду за филтрацију након што је дигестивни сок успешно филтриран;

(к) мембрана за филтрацију узима се пинцетама, држећи мембрану за руб. Мембрана за филтрацију пресавија се најмање четири пута и ставља у конусну цевчицу од 15 ml. Одабир конусну цевчице мора се прилагодити тучку;

(л) мембрана за филтрацију гура се на дно конусне цевчице од 15 ml помоћу тучка и снажно притиска, вршећи око 20 узастопних покрета напред-назад тучком, који би требало позиционирати у прегибу мембране за филтрацију према упутствима произвођача;

(љ) пипетом се додаје  $0,5 \text{ ml} \pm 0,01$  ml узорка разређивача у конусну цевчицу од 15 ml, а мембрана за филтрацију се хомогенизује помоћу тучка узастопним кратким покретима напред-назад теком 30 секунди, избегавајући нагле покрете, како би се ограничило прскање садржаја према упутствима произвођача;

(м) сваки узорак, негативна и позитивна контрола, распоређују се помоћу пипете у разна поља картице за аглутинацију према упутствима произвођача;

(н) латекс куглице додају се пипетом у свако поље картице за аглутинацију, према упутствима произвођача, тако да се не доведу у контакт са узорцима и контролама. У сваком пољу, латекс куглице се лагано мешају штапићем за једнократну употребу, док хомогени садржај не прекрије цело поље;

(њ) картица за аглутинацију ставља се у тродимензионалну мешалицу и мешају се током  $10 \text{ +/- } 1$  минута према упутствима произвођача;

(о) након истека времена одређеног према упутствима произвођача, мешање се зауставља и картица за аглутинацију ставља се на равну плочу и резултати реакције читају се одмах према упутствима произвођача. Ако је узорак позитиван, морају се појавити агрегати куглица. Ако је узорак негативан, суспензија остаје хомогена без агрегата куглица.

3.2. Узорци мањи од 100 g како је утврђено у Глави I, одељак 3. пододељак 3.2. овог прилога.

За узорке мање од 100 g примењује се поступак утврђен у Глави I, одељак 3, пододељак 3.2. овог прилога.

3.3. Позитивни или сумњиви резултати

Ако се прегледом збирног узорка добије позитиван или сумњив резултат латекс аглутинације, узима се додатни узорак од 20 g од сваке свиње, у складу са Главом I, одељак 2, тачка (а) овог прилога. Узорци од по 20 g од пет свиња испитују се као збирни узорак применом методе описане у пододељку 3.1. овог одељка. На тај се начин морају испитати узорци из 20 збира од по пет свиња.

Ако се од пет свиња добије позитивна латекс аглутинација, узима се додатних 20 узорака од појединих свиња из збира и сваки се испитује одвојено помоћу методе описане у пододељку 3.1. овог одељка.

Ако се добије позитиван или нејасан резултат латекс аглутинације, најмање 20 g мишића свиња мора да се пошаље националној референтној лабораторији, ради валидације помоћу једне од метода описаних у Глави I овог прилога.

Узорци паразита морају да се држе у 90% етил алкохолу ради конзервирања и идентификације на нивоу врсте/специјеса у ЕУ референтној лабораторији или националној референтној лабораторији.

После прикупљања паразита, „позитивна“ течност мора да се деконтаминира загревањем на најмање 60 °C.

3.4. Поступак чишћења и деконтаминације после позитивног или сумњивог резултата

Ако се испитивањем збирног или појединачног узорка добије позитиван или сумњив резултат латекс аглутинације, сви материјали у контакту са месом (посуде за мешање и оштрица, тучак, посуда, штапић за мешање, сензор температуре, конусни левак за филтрацију, сито и пинцете) морају се пажљиво деконтаминирати потапањем неколико секунди у топлој води (65 до 90 °C).

Остаци меса или неактивне ларве које могу остати на површини меса, могу се уклонити чистим сунђером и текућом водом. Ако је потребно, може се додати неколико капи детерџента ради одмашћивања опреме. Препоручује се затим да се сваки комад опреме темељно испере како би се уклонио сваки траг детерџента.

Е. Тест вештачке дигестије за *in vitro* откривање ларви *Trichinella spp.* у узорцима меса, PrioCHECK® *Trichinella* AAD кит

Метода се сматра еквивалентном само за испитивање меса домаћих свиња.

PrioCHECK® *Trichinella* AAD кит употребљава се у складу са упутствима за употребу опреме помоћу левака за одвајање (Lenz NS 29/32) и стакленом епруветом од 80 ml.

### ГЛАВА III ТРИХИНОСКОПСКИ ПРЕГЛЕД

1. Уређај:

а) трихиноскоп опремљен лампом, са увећањем 60–80 пута и 80–100 пута или стереомикроскоп са сопственим извором светлости чији интензитет може да се подешава;

б) компресионо стакло (компресоријум), које се састоји од две стаклене плоче, од којих је једно стакло подељено (обележено) на поља једнаке површине;

в) мале закривљене маказе;

г) мале пинцете;

д) нож за сечење узорака;

ђ) мале нумерисане посуде са преградама за одвојено држање узорака;

е) пипета;

ж) стаклена посуда са сирћетном киселином и стаклена посуда са раствором натријум хидроксида за просветљивање калцификованих ларви и омекшавање осушеног меса.

2. Узимање узорака

У случају целих трупова, узима се неколико узорака величине лешника од сваке животиње:

(а) код домаћих свиња, узорци се узимају од оба корена дијафрагме, на прелазу мишићног у тетивасти део;

(б) ако неки мишићи нису доступни, узима се укупно четири узорка од мишића који су на располагању;

(в) од меса у комадима, узима се четири узорка величине лешника попречно-пругастиг мишићног ткива, ако је могуће без масног ткива, са различитих места, по могућности у близини кости или тетива.

### 3. Поступак:

а) по правилу, у компресоријум се ставља  $1,0 \pm 0,1$  g меса, што одговара 28 исечака (комадића) меса величине зрна овса са једне половине трупа. Ако је неопходно, треба употребити два компресоријума са укупно 56 исечака величине зрна овса;

б) ако су присутна оба корена дијафрагме на трупу домаће свиње, службено лице (прегледач) које прегледа месо на присуство трихинеле, сече по 28 комадића величине зрна овса од узорака, што укупно износи 56 исечака;

в) ако је присутан само један корен дијафрагме, 56 исечака се сече са различитих места, ако је могуће на прелазу мишићног у тетивасти део;

г) од сваког узорка узетог од друга четири мишића дивље свиње, сече се седам комадића величине зрна овса, што укупно износи 28 исечака;

д) службено лице (прегледач) које прегледа месо на присуство трихинеле, притиска/компримује 56 исечака између стаклених плоча, тако да нормалан штампани/новински текст може да се чита кроз препарат;

ђ) ако је узорак (меса) за испитивање сув и стар, пре компресије мора да се омекша у току 10 до 20 минута у раствору једног дела натријум хидроксида и два дела воде;

е) од сваког узорка узетог од меса у комадима, службено лице (прегледач) које прегледа месо на присуство трихинеле, сече по 14 комадића величине зрна овса, што укупно износи 56 исечака;

ж) микроскопски преглед сваког препарата мора да се изведе полако и пажљиво, при увећању од 60 до 80 пута;

з) ако се трихиноскопским прегледом уочи сумњиво поље, преглед овог поља трихиноскопом мора да се уради при највећем увећању (80 до 100 пута);

и) у случају несигурног резултата, испитивање се понавља на другим узорцима и исечцима/препаратима све док се не добије поуздан резултат. Трихиноскопски преглед једног компресоријума мора да траје најмање 6 минута;

ј) минимално време одређено за преглед једног компресоријума, не укључује време потребно за узимање узорака и припрему препарата.

#### 3.1. Позитивни или сумњиви резултати

Ако се прегледом узорка добије позитиван или сумњив резултат, обавезно је узорке прегледати, у складу са Главом I овог прилога.

#### 3.2. Поступак чишћења и деконтаминације после позитивног или сумњивог резултата

Ако се испитивањем узорка добије позитиван или сумњив резултат, сви материјали у контакту са месом морају се пажљиво деконтаминирати потапањем неколико секунди у топлој води (65 до 90 °C).

Прилог 2

## ИСПИТИВАЊЕ МЕСА ДРУГИХ ВРСТА ЖИВОТИЊА

Месо коња, месо дивљачи и друге врсте меса које би могле да садрже трихинеле, испитују се у складу са једном од метода вештачке дигестије наведених у Прилогу 1 овог правилника, уз следеће измене:

(а) узорци тежине најмање 10 g узимају се из мишића језика или спољашњег жвакаћег мишића (m. masseter) коња и из мишића предње ноге, језика или дијафрагме (diaphragma) дивљих свиња;

(б) у случају када мишићи из тачке (а) овог прилога недостају код коња, узима се већи узорак корена дијафрагме на прелазу у тетивасти део. Са мишића мора да се одстрани везивно и масно ткиво;

(в) најмање 5 g узорка се дигестира се у складу са референтном методом испитивања из Прилога 1, Главе I овог правилника или у складу са еквивалентном методом из Прилога 1, Главе II овог правилника. Укупна тежина мишића који се испитује у свакој дигестији не сме бити већа од 100 g приликом испитивања методом из Прилога 1, Глава I и Глава II, део А) и Б) овог правилника, односно од 35 g у случају испитивања методом из Прилога 1, Глава II, део В) овог правилника;

(г) када је утврђено присуство трихинеле, узима се додатних 50 g узорка за поновно независно испитивање,

(д) не доводећи у питање прописе о очувању животињских врста, месо дивљих животиња као што су медведи, сисари месождери (укључујући морске сисаре) и гмизавци, осим дивљих свиња, мора да се испита узимањем 10 g узорка мишића са предилекционих места, или већег узорка, ако таква места нису на располагању.

Предилекциона места су:

– код медведа: дијафрагма, жвакаћи мишић (m. masseter) и језик,

- код моржа: језик,
  - код крокодила: жвакаћи мишићи (*m. masseter* и *m. pterygoideus*) и међуребарни мишићи (*mm. intercostales*),
  - код птица: мишићи главе (нпр. *m. masseter* и вратни мишићи);
- (ћ) трајање вештачке дигестије мора бити довољно дуго да се осигура одговарајућа дигестија ткива ових животиња, али не сме да траје дуже од 60 минута.