

627.

Na osnovu člana 9 alineja 11 Zakona o bezbjednosti hrane ("Službeni list CG", broj 57/15), Vlada Crne Gore, na sjednici od 31. marta 2016. godine, donijela je

**UREDBU
O MJERAMA ZA SPRJEČAVANJE TRIHINELE
KOD LJUDI***

Predmet

Član 1

Ovom uredbom propisuju se mjere za sprječavanje trininele kod ljudi, način uzorkovanja trupova i mesa domaćih i divljih svinja, konja i drugih vrsta životinja prijemčivih na trihinelu, metode za otkrivanje trihinele, određivanje statusa gazdinstva i uslovi za uvoz mesa.

Definicija trihinele

Član 2

Trihinela je parazit iz razreda nematoda koja pripada vrsti roda *Trichinella*.

Mjere za sprječavanje trininele kod ljudi

Član 3

Pravno i fizičko lice ili preduzetnik koji proizvodi meso i proizvode od mesa porijeklom od domaćih i divljih svinja, konja, medvjeda, sisara mesojeda (uključujući morske sisare) i gmizavaca koji su prijemčivi na trihinelu (u daljem tekstu: subjekat u poslovanju hranom) može da stavlja na tržište meso i proizvode od mesa, samo ako je rezultat ispitivanja na trihinelu negativan.

Način uzorkovanja trupova mesa i metode za otkrivanje trihinele

Član 4

(1) Ispitivanje mesa svinja na trihinelu vrši se u objektima u kojima se obavlja klanje svinja (u daljem tekstu: klanica) kao dio veterinarskog pregleda poslije klanja (post mortem pregled) uzimanjem uzoraka sa trupova i to:

1) svih trupova rasplodnih krmača i nerasta ili najmanje 10 % trupova ostalih kategorija svinja sa gazdinstava ili kompartmenta koja imaju status kontrolisanog držanja svinja;

2) svih trupova svih kategorija svinja sa gazdinstava koja nemaju status gazdinstva sa kontrolisanim držanjem svinja.

(2) Uzorci iz stava 1 ovog člana uzimaju se i ispituju na trihinelu:

1) referentnom metodom ispitivanja iz Priloga 1 (Dio 1) koji je sastavni dio ove uredbe; ili

2) ekvivalentnom metodom ispitivanja iz Priloga 1 (Dio 2) ove uredbe.

(3) Uzimanje uzoraka sa trupova divljih svinja, konja, medvjeda, sisara mesojeda (uključujući morske sisare) i gmizavaca prijemčivih na trihinelu vrši se u klanicama ili objektima za obradu i rasijecanje divljači, u okviru post mortem pregleda.

(4) Uzorci iz stava 3 ovog člana uzimaju se sa svakog trupa i ispituju u skladu sa Prilogom 1 ove uredbe i Prilogom 2 koji je sastavni dio ove uredbe.

(5) Subjekt u poslovanju hranom dužan je da u klanici uspostavi i da primjenjuje sistem koji garantuje potpunu sledljivost trupova do dobijanja rezultata ispitivanja na trihinelu.

(6) Subjekt u poslovanju hranom može da vrši rasijecanje trupova domaćih svinja i konja u najviše šest djelova u klanici ili u prostoriji za rasijecanje koja se nalazi u sastavu klanice, ako je uspostavio i primjenjuje sistem iz stava 5 ovog člana.

(7) Subjekat u poslovanju hranom može da vrši rasijecanje trupova domaćih svinja i konja i u objektu za rasijecanje mesa koji se nalazi uz klanicu ili je odvojen od klanice pod uslovom da se:

- 1) rasijecanje vrši pod nadzorom službenog veterinara;
- 2) trup ili njegovi djelovi otpremaju samo u jedan objekat za rasijecanje;
- 3) objekat za rasijecanje mesa se nalazi na teritoriji Crne Gore; i
- 4) svi djelovi trupa proglašeni nepogodnim za ishranu ljudi, u slučaju pozitivnog nalaza na trihinelu.

(8) Uzorci sa pozitivnim nalazom na trihinelu dostavljaju se nacionalnoj referentnoj laboratoriji ili referentnoj laboratoriji Evropske unije, radi određivanja vrste trihinele.

Odstupanja

Član 5

(1) Izuzetno od člana 4 st. 1 i 2 ove uredbe meso domaćih svinja ne ispituje se na trihinelu ako:

1) je podvrgnuto postupku zamrzavanja u skladu sa Prilogom 3 koji je sastavni dio ove uredbe;

2) trupovi i meso potiču od neodbijenih domaćih svinja koje nijesu starije od pet nedjelja.

(2) Trupovi i meso domaćih svinja koji potiču od svinja sa gazdinstava ili kompartmenta koja imaju status kontrolisanog držanja svinja mogu se izuzeti od ispitivanja na trihinelu ako:

1) u posljednje tri godine nije utvrđena nijedna autohtona invazija trihinelom kod domaćih svinja koje se drže na tom gazdinstvu pod uslovom da se tokom tog perioda sprovodilo kontinuirano ispitivanje u skladu sa članom 4 ove uredbe; ili

2) na osnovu istorijskih podataka o kontinuiranom ispitivanju sprovedenom na zaklanim svinjama, postoji 95% pouzdanost da prevalencija trihinele nije veća od jednog slučaja na milion u toj populaciji.

(3) O odstupanjima iz stava 1 ovog člana, obavještava se Evropska komisija i države članice Evropske unije jednom godišnje u skladu sa Prilogom 4 koji je sastavni dio ove uredbe.

Postupanje tokom ispitivanja na trihinelu

Član 6

(1) Subjekat u poslovanju hranom, do dobijanja negativnog rezultata ispitivanja na trihinelu, ne smije iz klanice da otpremi:

1) trupove životinja iz člana 4 st. 1 i 3 ove uredbe ili njihove djelove;

2) ostale djelove životinja iz tačke 1 ovog stava namijenjene za ishranu ljudi ili životinja, koji sadrže tkivo poprečno-prugastih mišića.

(2) Trup životinje od kojeg je uzet uzorak za ispitivanje na trihinelu nakon dobijanja negativnog rezultata ispitivanja na trihinelu označava se propisanom zdravstvenom oznakom.

(3) Subjekat u poslovanju hranom može iz klanice da otpremi otpad životinjskog porijekla i nusproizvode životinjskog porijekla koji nijesu namijenjeni ishrani ljudi i koji ne sadrže poprečno-prugaste mišiće prije dobijanja rezultata ispitivanja na trihinelu, osim u slučaju naloga službenog veterinara za ispitivanje na trihinelu ili prethodnu obradu, prije iznošenja iz klanice.

Određivanje statusa gazdinstava sa kontrolisanim držanjem svinja

Član 7

(1) Gazdinstvo ili kompartment stiče status gazdinstva sa kontrolisanim držanjem svinja ukoliko ispunjava uslove iz Priloga 5 koji je sastavni dio ove uredbe.

(2) Kontrolisano držanje svinja je držanje svinja čije se držanje i uzgoj vrši pod kontrolom pravnog i fizičkog lica ili preduzetnika koje je trajno ili privremeno odgovoran za svinje (u daljem tekstu: držalac svinja);

(3) Kompartment je više gazdinstava na kojima se drže svinje pod kontrolisanim uslovima držanja svinja.

(4) Gazdinstvo gubi status gazdinstva sa kontrolisanim držanjem svinja ako se:

1) kontrolom utvrdi da gazdinstvo ne ispunjava uslove iz stava 1 ovog člana; ili

2) kod domaće svinje porijeklom sa gazdinstva sa kontrolisanim držanjem utvrdi prisustvo Trihinelle.

(5) U slučaju iz stava 4 ovog člana službeni veterinar:

1) naređuje ispitivanje svih domaćih svinja sa tog gazdinstva prije klanja;

2) naređuje praćenje i testiranje uzoraka mesa svih rasplodnih svinja koje dolaze na gazdinstvo i po mogućnosti svih životinja koje su napustile gazdinstvo u zadnjih šest mjeseci od dobijanja pozitivnog nalaza na trihinelu, prema metodama iz Priloga 1 ove uredbe;

3) sprovodi i istražuje ukoliko je to moguće, puteve širenja invazije parazita prometom mesa domaćih svinja zaklanih u periodu koji je prethodio pozitivnom nalazu, prema potrebi;

4) sprovodi epizotološko ispitivanje kako bi otkrio uzrok zaraze, prema potrebi;

5) preduzima odgovarajuće mjere kada se invadirani trup ne može identifikovati u klanici i to:

a) povećanje veličine svakog uzorka mesa uzetog za ispitivanje sa sumnjivih trupova;

b) proglašavanje trupa nepodesnim za ishranu ljudi;

c) neškodljivo uklanjanje trupova sa pozitivnim rezultatom na trihinelu, sumnjivih trupova ili njihovih djelova.

(6) Držalac svinja čije gazdinstvo ima status gazdinstva sa kontrolisanim držanjem svinja dužan je da obavijesti organ uprave nadležan za bezbjednost hrane (u daljem tekstu: Uprava) ukoliko to gazdinstvo više ne ispunjava uslove iz Priloga 5 ove uredbe.

(7) U slučaju iz st. 4 i 6 ovog člana gazdinstvo se briše iz kompartmenta dok se ne otklone razlozi zbog kojih je to gazdinstvo izgubilo status gazdinstva sa kontrolisanim držanjem svinja.

(8) Gazdinstvo koje je izgubilo status gazdinstva sa kontrolisanim držanjem svinja može ponovo steći status gazdinstva sa kontrolisanim držanjem svinja nakon ispunjavanja uslova iz Priloga 5 ove uredbe.

(9) O dobijanju, gubitku i ponovnom dobijanju statusa gazdinstva ili kompartmenta sa kontrolisanim držanjem svinja obavještava se Evropska komisija i države članice Evropske unije.

Uslovi za uvoz mesa

Član 8

(1) Meso životinja koje su prijemčive na trihinelu koje sadrži poprečno-prugaste mišiće može se uvoziti u Crnu Goru samo ako je rezultat ispitivanja na trihinelu negativan.

(2) Izuzetno od stava 1 ovog člana svinje, meso svinja i proizvodi od mesa svinja mogu se uvoziti bez ispitivanja na trihinelu ako potiču iz država odnosno dijela država kojima je Evropska komisija odobrila odstupanja u skladu sa članom 5 ove uredbe.

(3) Pošiljku svinja namjenjenih za uvoz u Crnu Goru, mora da prati sertifikat u koji se unose podaci o gazdinstvu ili kompartmentu sa kontrolisanim držanjem svinja, a za pošiljke mesa svinja ili proizvoda od mesa svinja, obrađenih želudaca, bešika i crijeva u sertifikat se unose podaci o ispitivanju na trihinelu koje je izvršeno u državi porijekla mesa.

Novčane kazne

Član 9

(1) Novčanom kaznom u iznosu od 500 eura do 10.000 eura kazniće se za prekršaj pravno lice, ako:

1) u klanici ne uspostavi i/ili ne primjenjuje sistem koji garantuje potpunu sledljivost trupova do dobijanja rezultata ispitivanja na trihinelu (član 4 stav 5);

2) vrši rasijecanje trupova domaćih svinja i/ili konja u više od šest djelova u klanici ili u prostoriji za rasijecanje koja se nalazi u sastavu klanice i/ili nije uspostavio i ne primjenjuje sistem koji garantuje potpunu sledljivost trupova do dobijanja rezultata ispitivanja na trihinelu (član 4 stav 6);

3) vrši rasijecanje trupova domaćih svinja i/ili konja u objektu za rasjecanje mesa koji se nalazi uz klanicu ili je odvojen od klanice bez nadzora službenog veterinara (član 4 stav 7 tačka 1);

4) vrši rasijecanje trupova domaćih svinja i/ili konja u objektu za rasjecanje mesa koji se nalazi uz klanicu ili je odvojen od klanice, a svi djelovi trupa se ne proglašavaju nepogodnim za ishranu ljudi, u slučaju pozitivnog nalaza na trihinelu (član 4 stav 7 tačka 4);

5) otpremi iz klanice trupove životinja iz člana 4 st. 1 i 3 ove uredbe ili njihove djelove prije dobijanja negativnog rezultata ispitivanja na trihinelu (član 6 stav 1 tačka 1);

6) otpremi iz klanice ostale djelove životinja iz člana 6 stav 1 tačka 1 ove uredbe namijenjene za ishranu ljudi ili životinja, koji sadrže tkivo poprečno-prugastih mišića prije dobijanja negativnog rezultata ispitivanja na trihinelu (član 6 stav 1 tačka 2);

7) otpremi otpad životinjskog porijekla i nusproizvode životinjskog porijekla koji nijesu namijenjeni ishrani ljudi i koji ne sadrže poprečno-prugaste mišiće prije dobijanja rezultata ispitivanja na trihinelu, a službeni veterinar je naložio ispitivanje na trihinelu ili prethodnu obradu, prije iznošenja iz klanice (član 6 stav 3);

8) ne obavijesti Upravu ukoliko njegovo gazdinstvo koje ima status gazdinstva sa kontrolisanim držanjem svinja više ne ispunjava uslove iz Priloga 5 ove uredbe (član 7 stav 6).

(2) Za prekršaj iz stava 1 ovog člana kazniće se odgovorno lice u pravnom licu novčanom kaznom u iznosu od 100 eura do 1.000 eura.

(3) Za prekršaj iz stava 1 ovog člana kazniće se fizičko lice novčanom kaznom u iznosu od 100 eura do 1.000 eura.

(4) Za prekršaj iz stava 1 ovog člana kazniće se preduzetnik novčanom kaznom u iznosu od 200 eura do 3.000 eura.

Početak primjene

Član 10

Odredbe člana 4 stav 2 tačka 2 i st. 6 i 7, člana 5, člana 7 stav 9 i člana 8 stav 2 ove uredbe primjenjivaće se od dana pristupanja Evropskoj uniji.

Prestanak primjene

Član 11

Danom početka primjene ove uredbe prestaje primjena čl. 39 do 43 Pravilnika o načinu vršenja veterinarsko-sanitarnog pregleda i kontrole životinja pre klanja i proizvoda životinjskog porekla ("Službeni list SFRJ", broj 68/89 i "Službeni list SCG", broj 10/03) i člana 3 stav 2 Pravilnika o merama za suzbijanje trihineloze životinja ("Službeni list SRJ", broj 20/95) za životinje čije je meso namijenjeno za stavljanje na tržište.

Stupanje na snagu

Član 12

Ova uredba stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom listu Crne Gore", a primjenjivaće se od 1. januara 2017. godine.

* U ovu uredbu prenijeta je Implementaciona Uredba Komisije (EU) 2015/1375 od 10. avgusta 2015. o utvrđivanju posebnih pravila za službene kontrole trihinele u mesu/ Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1375 of 10 August 2015 laying down specific rules on official controls for Trichinella in meat

Broj: 08-912

Podgorica, 31. marta 2016. godine

Vlada Crne Gore
Predsjednik,
Milo Đukanović, s.r.

PRILOG 1

METODE ISPITIVANJA TRIHINELE

Dio 1

REFERENTNA METODA ISPITIVANJA

Referentna metoda ispitivanja trihinele je metoda vještačke digestije na magnetnoj mješalici za zbirne uzorke.

1. Oprema i reagensi za ispitivanje trihinele metodom vještačke digestije na magnetnoj mješalici za zbirne uzorke su:

- a) nož ili makaze i pinceta za rezanje uzoraka;
- b) podloga razdijeljena na 50 kvadrata od kojih se u svaki može staviti uzorak od oko 2 g mesa ili druga oprema koja pruža jednaku garanciju u vezi sa sljedivošću uzoraka;
- c) mješalica sa oštrim ivicama za usitnjavanje, a za uzorke veće od 3 g, mora se koristiti uređaj za mlevenje mesa sa otvorima veličine 2 do 4 mm ili makaze, a ako se radi o zamrznutom mesu ili jeziku (nakon uklanjanja površinskog sloja koji se ne može svariti), potreban je uređaj za mljevenje mesa i veličina uzorka mora da se značajno poveća;
- d) magnetna mješalica sa termostatski kontrolisanom pločom za zagrijavanje i štapićima presvučenim teflonom, dužine oko 5 cm;
- e) konusni stakleni separator sa lijevkom, zapremine najmanje 2 l, po mogućnosti sa ugrađenim sigurnosnim teflonskim ventilima;
- f) stalci, prstenovi i stezaljke;
- g) sita sa mrežicom (spoljašnji prečnik 11 cm) od nerđajućeg čelika čiji su otvori prečnika 180 µm;
- h) lijevci za držanje sita, sa unutrašnjim prečnikom koji nije manjim od 12 cm;
- i) staklene posude, zapremine 3 l;
- j) staklene menzure zapremine 50 do 100 ml ili kivete za centrifugiranje;

k) trihineloskop sa vodoravnim stočićem ili binokularni mikroskop sa izvorom svjetlosti čiji se intenzitet može podešavati;

l) veći broj petrijevih ploča prečnika 9 cm (za upotrebu sa binokularnim mikroskopom), kojima su na donjoj strani označena kvadratna polja za pregled dimenzija 10×10 mm;

m) posuda (bazen) za brojanje larvi (za upotrebu s trihineloskopom), izrađena od akrilnih ploča debljine 3 mm, s tim da:

- dno posude ima dimenzije 180x40 mm i da je iscrtano u kvadrate, i

- stranice imaju dimenzije 230x20 mm,

- su krajevi dimenzija 40x20 mm i da je dno i krajevi umetnuti između stranica, tako da se na krajevima formiraju dvije male ručke, gornja strana dna mora biti izdignuta 7 do 9 mm iznad baze okvira koji čine stranice i krajevi i moraju se zalijepiti odgovarajućim ljepilom;

n) aluminijska folija;

o) 25 % hlorovodonična kiselina;

p) pepsin aktivnosti: 1:10.000 NF (US National Formulary) što odgovara 1:12.500 BP (British Pharmacopoeia) i 2.000 FIP (Fédération Internationale de pharmacie), ili stabilizovan tečni pepsin sa najmanje 660 jedinica European Pharmacopoeia /ml;

q) voda iz slavine zagrijana na 46 do 48°C;

r) vaga tačnosti od najmanje 0,1 g;

s) posude većih zapremina (10 do 15 l), za sakupljanje upotrebljene digestivne tečnosti;

t) pipete različitih zapremina (1, 10 i 25 ml) i pipetori;

u) termometar s mjernim rasponom od 1 do 100°C;

v) sifon za vodu iz slavine.

2. Uzimanje uzoraka i količina uzorka potrebna za ispitivanja trihinele metodom vještačke digestije na magnetnoj mješalici za zbirne uzorke:

- u slučaju cijelog trupa domaće svinje, uzima se uzorak težine najmanje 1 g sa korijena dijafragme na prelazu mišićnog u tetivasti dio, mogu se koristiti i posebna kliješta za trihinelu za uzimanje uzoraka sa tačnošću između 1, 00 i 1,15 g;

- u slučaju rasplodnih krmača i nerastova, uzima se veći uzorak, težine najmanje 2 g, sa korijena dijafragme na prijelazu mišićnog u tetivasti dio;

- ukoliko na trupu nedostaje korijen dijafragme uzima se dvostruko veći uzorak od 2 g (ili 4 g kod rasplodnih krmača i nerastova) sa rebarnog ili grudnog dijela dijafragme ili sa žvakaćih mišića, jezika ili trbušnih mišića;

- za meso rasječeno na komade, uzima se uzorak od najmanje 5 g poprečno-prugastog mišića sa što manje masnog tkiva, po mogućnosti što bliže kosti ili tetivi, uzorak iste veličine uzima se od mesa koje nije namijenjeno kuvanju ili drugom načinu prerade nakon klanja;

- kod zamrznutih uzoraka, za analizu se uzima uzorak poprečno-prugastog mišićnog tkiva težak najmanje 5g.

Težina uzoraka mesa odnosi se na uzorak mesa bez masnog i vezivnog tkiva, a posebno treba voditi računa kod uzimanja uzoraka mišićnog tkiva jezika kako bi se izbjegla kontaminacija sa površinskim slojem jezika, koji je nesvarljiv i koji može onemogućiti pregledanje sedimenta.

3. Postupak vještačke digestije na magnetnoj mješalici za zbirne uzorke

3.1. Postupak za zbirne uzorke (u ukupnoj količini od 100 g uzoraka istovremeno):

a) $16 \pm 0,5$ ml hlorovodonične kiseline dodaje se u posudu zapremine 3 l u kojoj se nalaze 2 l vode iz slavine prethodno zagrijane na 46 do 48°C, u posudu se uroni štapić za miješanje, a posuda se postavi na prethodno zagrijanu ploču i tada započinje miješanje;

b) doda se $10 \pm 0,2$ g pepsina ili $30 \pm 0,5$ g tečnog pepsina;

c) 100 g uzorka prikupljenog u skladu sa tačkom 2 ovog dijela usitni se u mješalici;

d) usitnjeno meso prebacuje se u posudu zapremine 3 l u kojoj se nalaze voda, pepsin i hlorovodonična kiselina;

e) nož uređaja za usitnjavanje više puta se uranja u posudu sa digestivnim sokom, a posuda u kojoj se usitnjavalo meso ispere se malom količinom digestivnog soka da bi se odstranilo svo meso koje još uz nju prijanja;

f) posuda se pokrije aluminijskom folijom;

g) magnetna miješalica mora se podesiti tako da tokom rada održava stalnu temperaturu od 46 do 48°C, tokom miješanja digestivni sok se mora rotirati dovoljno velikom brzinom kako bi se stvorio duboki vir, a da ne prska iz posude;

h) digestivni sok se miješa dok se dijelovi mesa ne razgrade (oko 30 minuta) i tada se miješalica isključi, a digestivna tečnost izlije kroz sito u taložni lijevak, duže vrijeme digestije (najduže 60 minuta) može biti potrebno ako se vare određene vrste mesa (jezik, meso divljači);

i) postupak vještačke digestije smatra se zadovoljavajućim kada na situ ne ostane više od 5 % početne težine uzorka;

j) digestivni sok taloži se u lijevku 30 minuta;

k) nakon 30 minuta, 40 ml digestivnog soka brzo se odlije u mjerni cilindar ili kivetu za centrifugiranje;

l) digestivni sokovi i ostali tečni otpad čuvaju se u posudi dok se ne završi očitavanje rezultata;

m) 40 ml uzorka ostavi se da odstoji 10 minuta, zatim se 30 ml površinskog sloja tečnosti pažljivo izvuče usisavanjem radi odstranjivanja da bi ostalo ne više od 10 ml;

n) preostali uzorak sedimenta od 10 ml izlije se u posudu za brojanje larvi ili u petrijevu posudu;

o) cilindar ili kiveta za centrifugiranje isperu se sa najviše 10 ml vode iz slavine i dodaje se prethodno uzetom uzorku u posudi za brojanje larvi ili u petrijevoj posudi, nakon toga se uzorak pretražuje trihineloskopom ili binokularnim mikroskopom pod uvećanjem od 15 do 20 puta, a dozvoljeno je vizuelno pretraživanje upotrebom drugih tehnika pod uslovom da su provjerene na pozitivnim kontrolnim uzorcima i da je dokazano da daju jednako dobre ili bolje rezultate od uobičajenih metoda pregleda, u svim slučajevima sumnjivih područja ili pojave parazitima sličnih oblika mora se koristiti veće povećanje i to od 60 do 100 puta;

p) uzorci dobijeni vještačkom digestijom moraju se pregledati čim su gotovi, ni u kom slučaju se pregled ne smije odložiti za sljedeći dan.

Ako se sadržaj vještačke digestije ne pregleda u roku od 30 minuta nakon pripreme, taj sadržaj se mora razbistriti na sljedeći način: dobijeni uzorak od oko 40 ml izlije se u mjerni cilindar i ostavi se da odstoji 10 minuta, zatim se ukloni 30 ml površinskog sloja tečnosti tako da ostane volumen od 10 ml, koji se nadopuni vodom iz slavine do volumena od 40 ml, nakon daljeg taloženja u trajanju od 10 minuta, 30 ml površinskog sloja tečnosti odstranjuje se izvlačenjem sa površine, tako da preostane zapremina od 10 ml za pregled u petrijevoj posudi ili u posudi za brojanje larvi, a mjerni cilindar ispere se sa najviše 10 ml vode iz slavine i taj se ispirak dodaje uzorku za pregled u petrijevoj posudi ili u posudi za brojanje larvi.

Ako se kod pregleda na trininelu utvrdi da sediment nije bistar, uzorak se izliva u mjerni cilindar u koji se doliva voda iz slavine do ukupno 40ml pa se ponavlja postupak iz ove podtačke, a postupak se može ponoviti dva do četiri puta sve dok tečnost ne postane dovoljno bistra za pouzdano očitavanje.

3.2. Postupak za zbirne uzorke manje od 100 g

Ako je potrebno, zbirnom uzorku od 100 g može se dodati do 15 g uzorka i pregledati zajedno sa tim uzorcima u skladu sa podtačkom 3.1 ove tačke, a ako je uzorak veći od 15 g, mora se pregledati kao zasebni uzorak; za zbirne uzorke do 50 g, digestivni sok i sastojci mogu se smanjiti na 1 l vode, 8 ml hlorovodonične kiseline i 5 g pepsina.

3.3. Pozitivni ili sumnjivi rezultati

Kada pregled zbirnog uzorka da pozitivan ili sumnjiv rezultat, uzima se dodatni uzorak od 20 g od svake svinje u skladu sa tačkom 2 alineja 1 ovog dijela, a uzorci od po 20 g od pet svinja pregledaju se kao zbirni uzorak primjenom postupka iz podtačke 3.1 ove tačke i na ovaj način pregledaju se uzorci iz 20 grupa po pet svinja.

Kada se prisustvo trihinela dokaže u zbirnom uzroku od pet svinja, uzimaju se dodatni uzorci od 20 g od svake pojedine svinje iz te grupe i svaki od tih uzoraka pregleda se posebno upotrebom metode iz ovog dijela.

Uzorci parazita čuvaju se u 90% etil- alkoholu u svrhu konzerviranja i identifikacije na nivou vrste u nacionalnoj referentnoj laboratoriji ili referentnoj laboratoriji Evropske unije.

Nakon izdvajanja i sakupljanja parazita, pozitivne tečnosti (digestivni sok, površinski sloj tečnosti, ispirci, itd.) moraju se dekontaminirati zagrijavanjem na najmanje 60°C.

3.4. Postupak čišćenja i dekontaminacije nakon pozitivnog ili sumnjivog rezultata

Ako se pregledom zbirnog ili pojedinačnog uzorka dobije pozitivan ili sumnjiv rezultat, svi materijali i predmeti koji su u kontaktu sa mesom (posuda za mješanje i noževi, štapić za miješanje, senzor temperature, konusni lijevak za filtraciju, sito i pincete) moraju se pažljivo dekontaminirati pranjem u toploj vodi (65 do 90°C), a ako se pri pranju upotrebljava deterdžent, radi njegovog uklanjanja, svaki dio je potrebno detaljno isprati.

Dio 2

EKVIVALENTNE METODE

Ekvivalentne metode ispitivanja trihinele su:

- 1) mehanička metoda digestije zbirnog uzorka/tehnika sedimentacije;
- 2) mehanička metoda vještačke digestije zbirnog uzorka/tehnika „izdvajanje na filteru”;
- 3) metoda automatske vještačke digestije za zbirni uzorak težine do 35 g;
- 4) metoda vještačke digestije na magnetnoj miješalici za zbirne uzorke/„izdvajanje na filteru” i otkrivanje larvi pomoću lateks aglutinacijskog testa;
- 5) test vještačke digestije za in vitro otkrivanje larvi trichinella spp. u uzorcima mesa, priocheck® trichinella aad kit.

Odjeljak A

1. Oprema i reagensi za ispitivanje trihinele mehaničkom metodom digestije zbirnog uzorka/tehnika sedimentacije:

- a) nož ili makaze za rezanje uzoraka;
- b) podmetači razdijeljeni na 50 kvadrata, od kojih se u svaki može staviti uzorak od oko 2 g mesa ili druga oprema koja pruža jednaku garanciju u vezi sa sljedivošću uzoraka;
- c) uređaj za mljevenje mesa ili električna sjeckalica;
- d) miješalica tipa Stomacher lab-blender 3 500 thermo;
- e) plastične vrećice prikladne za Stomacher lab-blender;
- f) konični separatori, zapremnine 2 l, po mogućnosti sa ugrađenim sigurnosnim teflonskim ventilima;
- g) stalci, prstenovi i stezaljke;
- h) sita s mrežicom od nerđajućeg čelika čiji su otvori prečnika 180 µm;
- i) lijevci, za držanje sita;
- j) staklene menzure zapremine 100 ml;
- k) termometar u rasponu od 1 do 100 °C;
- l) naprava za vibriranje, na primjer električni aparat za brijanje, bez glave;
- m) sklopka koja se uključuje i isključuje u razmacima od jednog minuta;

n) trihineloskop sa vodoravnim stočićem ili binokularni mikroskop, s izvorom svjetlosti čiji se intenzitet može podešavati;

o) posuda za brojanje larvi i veći broj petrijevih posuda prečnika 9 cm iz tačke 1 podtač. 1 i m Dio 1 ovog priloga;

p) 17,5 % hlorovodična kiselina;

q) pepsin aktivnosti: 1:10 000 NF (US National Formulary) što odgovara 1:12 500 BP (British Pharmacopoeia) i 2 000 FIP (Fédération Internationale de pharmacie), ili stabilizovani tečni pepsin sa najmanje 660 jedinica Europske farmakopeje/ml;

r) veći broj posuda zapremnine 10l za dekontaminaciju opreme, npr. pomoću formalina kao i za preostali digestivni sok kada je test uzoraka pozitivan;

s) vaga sa tačnošću od najmanje 0,1 g.

2. Uzimanje uzoraka i količina uzorka potrebna za ispitivanja trihinele mehaničkom metodom digestije zbirnog uzorka/tehnika sedimentacije

Uzimanje uzoraka i određivanje količine uzoraka potrebnog za digestiju vrši se u skladu sa tačkom 2 Dio 1 ovog priloga.

3. Postupak mehaničke metode digestije zbirnog uzorka/tehnika sedimentacije:

3.1. Mljevenje

Ako se uzorci mesa prethodno samelju u mašini za mljevenje mesa poboljšava se kvalitet digestije, a ako se koristi električna miješalica, mješalica se mora uključivati tri do četiri puta, svaki put po jednu sekundu.

3.2. Postupak digestije mehaničkom metodom digestije zbirnog uzorka/tehnika sedimentacije

Postupak digestije mehaničkom metodom digestije zbirnog uzorka/tehnika sedimentacije može se sprovesti na zbirnim uzorcima od 100 g ili na uzorcima manjim od 100 g.

3.2.1. Zbirni uzorci (u ukupnoj količini od 100 g uzoraka istovremeno)

a) Na uređaj Stomacher lab-blender 3 500 stavlja se dvostruka plastična vrećica, a temperatura se podesi na 40 do 41 °C;

b) u unutrašnju plastičnu vrećicu ulije se 1,5 l vode prethodno zagrijane na 40 do 41 °C;

c) vodi u Stomacheru doda se 25 ml 17,5 % hlorovodonične kiseline;

d) tome se doda 100 uzoraka od kojih je svaki težak oko 1 g (na temperaturi od 25 do 30 °C), koji su uzeti iz pojedinačnih uzoraka u skladu sa tačkom 2 ovog odeljka;

e) na kraju se doda 6 g pepsina ili 18 ml tečnog pepsina; ovaj redoslijed se mora strogo poštovati radi spriječavanja razgradnje pepsina;

f) Stomacher zatim 25 minuta miješa sadržaj vrećice;

g) plastična vrećica se izvadi iz Stomachera, a digestivni sok se filtrira kroz sito u laboratorijsku čašu zapremine 3 l;

h) plastična vrećica se ispere sa oko 100 ml vode, koja se zatim upotrijebi za ispiranje sita i na kraju se doda filtratu unutar laboratorijske čaše;

i) zbirnom uzorku od 100 uzoraka može se dodati do 15 pojedinačnih uzoraka i pregledati zajedno s tim uzorcima.

3.2.2. Manji zbirni uzorci (manje od 100 uzoraka)

a) Na uređaj Stomacher lab-blender 3 500 stavlja se dvostruka plastična vrećica, a temperatura se podesi na 40 do 41 °C;

b) digestivni sok se priprema miješanjem oko 1,5 l vode i 25 ml 17,5 % hlorovodonične kiseline, tome se dodaje 6 g pepsina i sve se pomiješa pri temperaturi od 40 do 41 °C; ovaj redoslijed se mora strogo poštovati radi spriječavanja razgradnje pepsina;

c) od digestivnog soka se odvoji zapremina koja odgovara odnosu od 15 ml po gramu uzorka (npr. za 30 uzoraka bio bi potreban volumen $30 \times 15 \text{ ml} = 450 \text{ ml}$) i stavi se u unutrašnju od dvije plastične vrećice zajedno sa uzorcima mesa teškim oko 1 g (pri

temperaturi od 25 do 30°C), koji su uzeti iz svakog pojedinog uzorka u skladu sa tačkom 2 ovog odeljka;

d) u spoljnu vrećicu se ulije voda zagrijana na oko 41°C, tako da ukupna zapremina ovih vrećica bude 1,5 l i Stomacher zatim 25 minuta miješa sadržaj vrećica;

e) plastična vrećica se izvadi iz Stomachera, a digestivni sok se filtrira kroz sito u laboratorijsku čašu zapremine 3 l;

f) plastična vrećica se ispiri sa oko 100 ml vode (na 25 do 30 °C), koja se zatim upotrijebi za ispiranje sita i na kraju se doda filtratu unutar laboratorijske čaše.

3.3. Sakupljanje larvi sedimentacijom vrši se na sljedeći način:

a) digestivnom soku se dodaje led (300 do 400 g leda u listićima ili zdrobljenog leda), tako da se njegov volumen poveća na oko 2 l, a zatim se digestivni sok miješa dok se ne otopi led; u slučaju manjih zbirnih uzoraka količina leda mora se proporcionalno smanjiti;

b) rashlađeni digestivni sok prenese se u separator zapremine 2 l, koji je opremljen spravom za vibraciju u posebnom držaču;

c) tokom sedimentacije koja traje 30 minuta, sedimentacijski lijevak vibrira sa prekidima, tj. izmjenjuju se jedan minut vibriranja i jedan minut pauze;

d) nakon 30 minuta, 60 ml uzorka taloga brzo se odlije u mjerni cilindar od 100 ml (lijevak se nakon upotrebe ispere rastvorom deterdženta);

e) 60 ml uzorka ostavi se da odstoji 10 minuta, a zatim se površinski sloj tečnosti pažljivo izdvoji usisavanjem, tako da ostane volumen od 15 ml za pregled na prisustvo larvi;

f) za usisavanje se može upotrijebiti špric za jednokratnu upotrebu, opremljen plastičnom cjevčicom, a dužina te cjevčice mora biti takva da, kada se krilca šprica postave na rub mjerenog cilindra, u cilindru ostane 15 ml;

g) preostalih 15 ml izliva se u posudu za brojanje larvi ili u dvije petrijeve posude i pregleda upotrebom trihineloskopa ili binokularnog mikroskopa;

h) mjerni cilindar se ispere sa 5 do 10 ml vode iz slavine i taj se ispirak dodaje uzorku;

i) sadržaj vještačke digestije se mora pregledati čim je gotov, ni u kom slučaju se pregled ne smije odložiti za sljedeći dan.

Kada sadržaj vještačke digestije nije bistar ili se ne pregleda u roku od 30 minuta nakon njegove pripreme, on se mora razbistriti na sljedeći način:

- konačni uzorak od oko 60 ml izlije se u mjerni cilindar i ostavi da odstoji 10 minuta; zatim se usisavanjem otkloni 45 ml površinskog sloja tečnosti, a preostalih 15 ml se nadopuni sa 45 ml vode iz slavine;

- nakon sledećeg stajanja od 10 minuta, opet se izvuče 30 ml površinskog sloja tečnosti, a preostalih 15 ml za pregled ulije se u petrijevu posudu ili u posudu za brojanje larvi;

- mjerna menzura se ispere sa 10 ml vode iz slavine i taj se ispirak dodaje uzorku za pregled u petrijevoj posudi ili u posudi za brojanje larvi.

3.4. Pozitivni ili sumnjivi rezultati

Kada je rezultat pozitivan ili sumnjiv, primjenjuju se odredbe iz tačke 3 podtačka 3.3 Dio 1 (Pozitivni ili sumnjivi rezultati) ovog priloga.

Odjeljak B

Mehanička metoda vještačke digestije zbirnog uzorka/tehnika „izdvajanje na filteru”

1. Oprema i reagensi za ispitivanje trihinele mehaničkom metodom vještačke digestije zbirnog uzorka/tehnika „izdvajanje na filteru”

Za ovu metodu koristi se oprema iz odeljka A tačka 1 ovog dijela i dodatna oprema:

- a) Gelmanov separator zapremine 1 l, opremljen držačem za filter (prečnika 45 mm);
- b) filterske ploče koje se sastoje od okrugle mreže izrađene od nerđajućeg čelika sa porama od 35 mikrona (prečnik ploče: 45mm), dva gumena prstena debljine 1mm (prečnik spolnog prstena: 45mm; prečnik unutrašnjeg prstena: 38mm), s tim da se okrugla mreža postavi između dva gumena prstena i za njih pričvrsti upotrebom dvokomponentnog ljepljivog materijala;
- c) Erlenmajerova tikvica zapremine 3 l opremljena straničnom cjevčicom za usisavanje;
- d) filterska pumpa;
- e) plastične vrećice, zapremnine najmanje 80 ml;
- f) sprava za plombiranje plastičnih vrećica;
- g) renilaza, jačine 1: 150 000 Sokslet jedinica na gram.

2. Uzimanje uzoraka i količina uzorka potrebna za ispitivanja trihinele mehaničkom metodom vještačke digestije zbirnog uzorka/tehnika „izdvajanje na filteru”

Sakupljanje uzoraka vrši se u skladu sa tačkom 2 Dio 1 ovog priloga.

3. Postupak mehaničke metode vještačke digestije zbirnog uzorka/tehnika „izdvajanje na filteru”

3.1. Mljevenje

Ako se uzorci mesa prethodno samelju u mašini za mljevenje mesa poboljšava se kvalitet digestije, a ako se koristi električna miješalica, ona se mora uključivati tri do četiri puta, svaki put po jednu sekundu.

3.2. Postupak digestije

Ovaj postupak se može sprovoditi na zbirnim uzorcima od 100 g ili na zbirnim uzorcima manjim od 100 g.

3.2.1. Zbirni uzorci (u ukupnoj količini od 100g uzoraka istovremeno) – u skladu sa podtačkom 3.2. tačka 3 odeljak A ovog dijela (3. 2. 1 Zbirni uzorci (u ukupnoj količini od 100g uzoraka istovremeno))

3.2.2. Manji zbirni uzorci (manje od 100 uzoraka) - u skladu sa podtačkom 3.2. tačka 3 odeljak A ovog dijela (3. 2. 2 Manji zbirni uzorci (manje od 100 uzoraka)) ovog dijela.

3.3. Sakupljanje larvi filtriranjem vrši se na sljedeći način:

a) digestivnom soku dodaje se led (300 do 400 g leda u listićima ili zdrobljenog leda), tako da se njegov volumen poveća na oko 2 l, a kada su uzorci manji, količina leda se mora proporcionalno smanjiti;

b) digestivni sok se zatim miješa dok se ne otopi led, rashlađena digestivna tečnost ostavi se najmanje tri minuta da bi se larve sklupčale;

c) Gelmanov separator opremljen držačem za filter i diskom sa filterom¹ stavlja se na Erlenmajerovu tikvicu koja je povezana sa pumpom filtera;

¹ Diskovi sa filterom ne smiju se nikad koristiti ako nisu potpuno čisti i ne smije se nikad dozvoliti da se diskovi koji nisu čisti osuše. Diskovi sa filterom mogu se čistiti tako da se tokom noći ostave uronjeni u rastvor renilaze, a prije upotrebe, moraju se oprati u svježem rastvoru renilaze upotrebom Stomachera.

d) digestivni sok ulije se u Gelmanov separator i filtrira, pred kraj filtriranja prolaz digestivnog soka kroz filter može se potpomoći primjenom usisavanja pomoću pumpe filtera, s tim da se usisavanje mora prekinuti prije nego što filter postane suv, tj. kada u lijevku ostane 2 do 5 ml tečnosti;

e) kada je sav digestivni sok profiltriran, disk sa filterom se skida i stavlja u plastičnu vrećicu zapremnine 80 ml zajedno sa 15 do 20 ml rastvora renilaze; rastvor ranilaze priprema se dodavanjem 2 g renilaze u 100 ml vode iz slavine;

f) plastična vrećica se dva puta plombira i postavi između unutrašnje i spoljne vrećice Stomachera;

g) pusti se Stomacher da usitnjava tri minuta, npr. dok radi na zbirnom ili nepotpunom uzorku;

h) nakon tri minuta, plastična vrećica se zajedno sa diskom, filterom i rastvorom renilaze vadi iz Stomachera i otvara makazama; tečni sadržaj se izlije u posudu za brojanje larvi ili u petrijevu posudu, a vrećica se ispere sa 5 do 10 ml vode, koja se zatim doda u posudu za brojanje larvi za pregled pomoću trihineloskopa ili u petrijevu posudu za pregled pomoću binokularnog mikroskopa;

i) sadržaj vještačke digestije mora se pregledati čim je gotov, ni u kom slučaju se pregled ne smije odložiti za sljedeći dan.

3.4. Pozitivni ili sumnjiv rezultati

Kada je rezultat pozitivan ili sumnjiv, primjenjuju se odredbe iz podtačke 3.3 tačka 3 Dio 1 (Pozitivni ili sumnjivi rezultati) ovog priloga.

Odjeljak C

Metoda automatske vještačke digestije za zbirni uzorak težine do 35 g

1. Oprema i reagensi za ispitivanje trihinele metodom automatske vještačke digestije za zbirni uzorak težine do 35 g:

- a) nož ili makaze za rezanje uzoraka;
- b) podmetači razdijeljeni na 50 kvadrata, od kojih se u svaki može staviti uzorak od oko 2 g mesa ili druga oprema koja pruža jednaka garancije u vezi sa sledljivošću uzoraka;
- c) miješalica Trichomatic 35® sa umetkom za filtriranje;
- d) hlorovodična kiselina težine $8,5 \pm 0,5\%$;
- e) prozirni polikarbonatni membranski filteri sa prečnikom od 50 mm i veličinom pora od 14 mikrona;
- f) pepsin aktivnosti: 1:10 000 NF (US National Formulary) što odgovara 1:12 500 BP (British Pharmacopoeia) i 2 000 FIP (Fédération Internationale de pharmacie), ili stabilizovani tečni pepsin sa najmanje 660 jedinica Europske farmakopeje/ml;
- g) vaga sa tačnošću od 0,1 g.
- h) pinceta sa ravnim vrhovima;
- i) više mikroskopskih stakalaca sa dužinom stranice najmanje 5 cm ili više petrijevih posuda prečnika najmanje 6cm, koji su sa donje strane zašiljenim instrumentom iscrtani u kvadrate veličine 10×10 mm;
- j) binokularni mikroskop sa izvorom svjetlosti (povećanje 15 do 60 puta) ili trihineloskop sa vodoravnom pločom;
- k) posuda za prikupljanje otpadnih tečnosti;
- l) veći broj posuda od 10 l za dekontaminaciju opreme, npr. pomoću formalina, kao i za preostali digestivni sok kada je test uzoraka pozitivan;
- m) termometar sa tačnošću od $0,5^{\circ}\text{C}$, u rasponu od 1 do 100°C .

2. Uzimanje uzoraka i količina uzorka potrebna za ispitivanja trihinele metodom automatske vještačke digestije za zbirni uzorak težine do 35g

Sakupljanje uzoraka vrši se u skladu sa tačkom 2 Dio 1 ovog priloga.

3. Postupak za ispitivanje trihinele metodom automatske vještačke digestije za zbirni uzorak težine do 35 g

3.1. Postupak digestije metodom automatske vještačke digestije za zbirni uzorak težine do 35 g

a) Namjestiti umetak za filtriranje u miješalicu, spojiti odvodnu cijev i postaviti je tako da se otpad odlijeva u posudu za otpad;

b) kada se miješalica uključi, započinje grijanje;

c) prije toga treba otvoriti i zatvoriti donji ventil koji je smješten ispod reakcijske komore;

d) zatim se dodaje do 35 uzoraka od kojih je svaki težine oko 1 g (na temperaturi od 25 do 30 °C), koji su uzeti iz pojedinačnih uzoraka u skladu sa tačkom 2 ovog odeljka, provjeriti jesu li odstranjeni veći komadi tetiva jer mogu da začepe membranski filter;

e) naliti vodu do ruba komore za tečnost koja je spojena sa miješalicom (oko 400ml);

f) uliti oko 30 ml hlorovodonične kiseline (8,5 %) do ivice manje, spojene komore za tečnost;

g) postaviti membranski filter ispod grubog filtera u držač uloška filtera;

h) na kraju se doda 7 g pepsina ili 21 ml tečnog pepsina, ovaj redoslijed mora se strogo poštovati radi spriječavanja razgradnje pepsina;

i) zatvoriti poklopac reakcijske komore i komore za tečnost;

j) odabrati vrijeme trajanja digestije, kratko vrijeme digestije (5 minuta) postavlja se za svinje u normalnom periodu za klanje dok se za druge uzorke postavlja duže vrijeme (8 minuta);

k) kada se na miješalici uključi dugme za početak, postupak dijeljenja i digestije počinje automatski, nakon kojeg slijedi filtriranje; a nakon 10 do 13 minuta, postupak je završen i automatski se prekida;

l) otvoriti poklopac reakcijske komore nakon što se provjeri da je komora prazna, ako je u komori ostalo pjene ili bilo kojeg drugog digestivnog soka, ponoviti postupak u skladu sa tačkom 5 ovog odeljka.

3.2. Sakupljanje larvi vrši se na sljedeći način:

a) odstraniti držač filtera i prenijeti membranski filter na stakalce ili petrijevu posudu;

b) pregledati membranski filter upotrebom binokularnog mikroskopa ili trihineloskopa.

3.3. Postupak čišćenja opreme

a) Kada je rezultat ispitivanja pozitivan, napuniti dvije trećine reakcijske komore miješalice ključalom vodom, a obična voda iz slavine se nalije u povezujuću komoru za tečnost tako da pokrije donji senzor, tada započinje automatsko čišćenje; držač filtera i sva druga opreme se dekontaminira, npr. upotrebom formalina;

b) kada je pregled za taj dan završen, napuniti vodom komoru za tečnost u miješalici i propustiti je kroz standardni ciklus.

3.4. Upotreba membranskog filtera

Svaki polikarbonatni membranski filter može se upotrijebiti najviše pet puta, s tim da se filter nakon svake upotrebe mora okrenuti, a nakon svake upotrebe treba ga provjeriti i utvrditi da nema oštećenja zbog kojih bi bio neprikladan za dalju upotrebu.

3.5. Metoda koja se upotrebljava kada je digestija nepotpuna i kada se ne može izvesti filtriranje

Kada je sproveden automatski ciklus miješalice u skladu sa podtačkom 3.1 tačka 3 ovog odeljka (Postupak digestije), poklopac reakcijske komore se otvara i provjerava da li je u komori ostalo pjene ili tečnosti.

U slučaju da se utvdi prisustvo pjene ili tečnosti:

- a) zatvoriti donji ventil ispod reakcijske komore;
- b) ukloniti držač filtera i prenijeti membranski filter na stakalce ili u petrijevu posudu;
- c) staviti novi membranski filter u držač filtera i pričvrstiti držač filtera;
- d) komoru miješalice za tečnost napuniti vodom dok se ne pokrije donji senzor;
- e) sprovesti ciklus automatskog čišćenja;
- f) kada je ciklus automatskog čišćenja gotov, otvoriti poklopac reakcijske komore i provjeriti ima li preostale tečnosti;
- g) ako je komora prazna, izvaditi držač filtera i pomoću pincete prenijeti membranski filter na stakalce ili u petrijevu posudu;
- h) pregledati oba membranska filtera u skladu sa podtačkom 3.2 tačka 3 ovog odeljka (Prikupljanje larvi);
- i) ako se filteri ne mogu pregledati, ponoviti cijeli postupak digestije sa dužim vremenom digestije u skladu sa podtačkom 3.1 tačka 3 ovog odeljka (Postupak digestije).

3.6. Pozitivni ili sumnjiv rezultati

Kada je rezultat pozitivan ili sumnjiv, primjenjuju se odredbe iz podtačke 3.3 tačka 3 Dio 1 (Pozitivni ili sumnjivi rezultati) ovog priloga.

Odjeljak D

Metoda vještačke digestije na magnetnoj miješalici za zbirne uzorke/„izdvajanje na filteru” i otkrivanje larvi pomoću lateks aglutinacijskog testa

Ova metoda se smatra ekvivalentnom samo za ispitivanje mesa domaćih svinja.

1. Oprema i reagensi za ispitivanje trihinele metodom vještačke digestije na magnetnoj miješalici za zbirne uzorke/„izdvajanje na filteru” i otkrivanje larvi pomoću lateks aglutinacijskog testa:

- nož ili makaze i pincete za rezanje uzorka;
- podloga razdijeljena na 50 kvadrata od kojih se u svaki može staviti uzorak od oko 2 g mesa ili druga oprema koja pruža jednaku garanciju u vezi sa sljedivošću uzoraka;
- miješalica sa oštrim ivicama za usitnjavanje, a ako su uzorci veći od 3 g, mora se koristiti uređaj za mljevenje mesa s otvorima veličine 2 do 4 mm ili makaze, a ako se radi o zamrznutom mesu ili jeziku (nakon uklanjanja površinskog sloja koji se ne može svariti), potreban je uređaj za mljevenje mesa i veličina uzorka mora da se značajno poveća;
- magnetna miješalica sa termostatski kontrolisanom pločom za zagrijavanje i štapićima presvučenim teflonom, dužine oko 5cm;
- staklene posude zapremnine 3 l;
- sita sa mrežicom (spoljašnji prečnik 11 cm) od nerđajućeg čelika čiji su otvori prečnika 180 µm;
- čelični uređaj za filtraciju sa filterom pora 20 µm i čeličnim lijevkom;
- vakuum pumpa;
- metalne ili plastične posude, zapremnine 10 do 15 l, za sakupljanje upotrebljene digestivne tečnosti;
- 3D klackalica;
- aluminijska folija;
- 25 % hlorovodonična kiselina;
- pepsin aktivnosti: 1:10.000 NF (US National Formulary) što odgovara 1:12.500 BP (British Pharmacopoeia) i 2.000 FIP (Fédération Internationale de pharmacie) ili stabilizovan tečni pepsin sa najmanje 660 jedinica European Pharmacopoeia /ml;
- voda iz vodovoda zagrijana na 46 do 48°C;
- vaga sa tačnošću od 0,1 g;

- pipete različitih zapremnina (1, 10 i 25 ml), mikropipete prema uputstvima proizvođača lateks aglutinacije i pipetori;
- najlonski filteri sa porama od 20 mikrona sa prečnikom koji odgovara filtracijskom sistemu;
- plastične ili čelične pincete od 10 do 15 cm;
- konične posudice od 15 ml;
- tučak sa teflonskim ili čeličnim vrhom koji odgovara koničnoj posudici;
- termometar sa tačnošću od 0,5°C sa mjernim rasponom od 1 do 100°C;
- lateks aglutinacijska karta u sklopu Trichin-L antigen test kita validirane pod oznakom br. EURLP_D_001/2011;
- pufer sa konzervansom (razrjeđivač za uzorak) u sklopu Trichin-L antigen test kita validirane pod oznakom br. EURLP_D_001/2011;
- pufer sa konzervansom (negativna kontrola) u sklopu Trichin-L antigen test kita validirane pod oznakom br. EURLP_D_001/2011;
- pufer sa dodatkom Trichinella spiralis antigena i konzervansom (pozitivna kontrola) u sklopu Trichin-L antigen test kita validiranog pod oznakom br. EURLP_D_001/2011;
- pufer sa polistirenskim kuglicama obloženim antitijelima sa konzervansom (lateks kuglice) u sklopu Trichin-L antigen test kita validirane pod oznakom br. EURLP_D_001/2011;
- štapići za jednokratnu upotrebu.

2. Uzimanje uzoraka i količina uzorka potrebna za ispitivanja trihinele metodom vještačke digestije na magnetnoj miješalici za zbirne uzorke/„izdvajanje na filteru” i otkrivanje larvi pomoću lateks aglutinacijskog testa

Sakupljanje uzoraka vrši se u skladu sa tačkom 2 Dio 1 ovog priloga.

3. Postupak za ispitivanje trihinele metodom vještačke digestije na magnetnoj miješalici za zbirne uzorke/„izdvajanje na filteru” i otkrivanje larvi pomoću lateks aglutinacijskog testa

3.1. Zbirni uzorci (u ukupnoj količini od 100 g uzoraka istovremeno)

- 16 ± 0,5 ml hlorovodonične kiseline udjela od 25% (0,2 % na kraju) dodaje se u posudu zapremine 3l u kojoj se nalazi 2,0l +/- 200 ml vode iz slavine prije toga zagrijane na 46 do 48°C; u posudu se uroni štapić za miješanje, a posuda se postavi na prethodno zagrijanu ploču i tada počinje miješanje;
- dodaje se 10 ± 1 g pepsina u prahu (ili 30 +/- 3 ml tečnog pepsina);
- 100 do 115 g uzoraka uzetih u skladu sa tačkom 2 ovog odjeljka usitnjava se u miješalici sa 150 ml +/- 15 ml prethodno zagrijanog digestivnog pufera;
- usitnjeno meso prebacuje se u posudu zapremine 3 l u kojoj se nalaze voda, pepsin i hlorovodonična kiselina;
- nož uređaja za usitnjavanje više se puta uranja u posudu sa digestivnim sokom, a posuda u kojoj se usitnjavalo meso ispere se malom količinom digestivnog soka radi uklanjanja svog mesa koje još uz nju prijanja;
- posuda se pokriva aluminijskom folijom;
- magnetna miješalica mora se podesiti tako da tokom rada održava stalnu temperaturu od 44 do 46°C, a tokom miješanja, digestivni sok mora se rotirati dovoljno velikom brzinom kako bi se stvorio duboki vir, a da ne prska iz posude;
- digestivni sok se miješa dok se dijelovi mesa ne razgrade (oko 30 minuta) nakon čega se miješalica isključi, a digestivni sok izlije kroz sito u taložni lijevak; duže vrijeme digestije (najduže 60 minuta) može biti potrebno ako se vare određene vrste mesa (jezik, meso divljači itd.);
- postupak vještačke digestije smatra se zadovoljavajućim kada na situ ne ostane više od 5% početne težine uzorka;

- najlonski filter sa otvorima od 20 mikrona stavlja se na filtracijski podupirač, a čelični konični lijevak za filtraciju fiksira se na podupirač sistemom za blokiranje i čelično sito sa porama prečnika 180 mikrona stavlja se na lijevak; dok je vakuum pumpa spojena sa filtracijskim podupiračem i metalnom ili plastičnom posudom za skupljanje digestivnog soka;

- miješanje se zaustavlja i digestivni sok se kroz sito ulijeva u lijevak za filtraciju, posuda se ispire sa oko 250ml tople vode, a tečnost za ispiranje ulijeva se u spremnik za filtraciju nakon što je digestivni sok uspješno filtriran;

- membrana za filtraciju uzima se pincetama držeći je za rub, presavija se najmanje četiri puta i stavlja u koničnu cjevčicu od 15 ml, a odabir konične cjevčice mora se prilagoditi tučku;

- membrana za filtraciju gura se na dno konične cjevčice od 15ml pomoću tučka i snažno pritiska vršeći oko 20 uzastopnih pokreta naprijed-nazad tučkom koji bi trebalo pozicionirati u pregibe membrane za filtraciju prema uputstvu proizvođača;

- pipetom se dodaje $0,5\text{ml} \pm 0,01\text{ ml}$ uzorka razrjeđivača u koničnu cjevčicu od 15 ml, a membrana za filtraciju homogenizuje se pomoću tučka uzastopnim kratkim pokretima naprijed-nazad tokom 30 sekundi, izbjegavajući nagle pokrete kako bi se ograničilo prskanje tečnosti, prema uputstvu proizvođača;

- svaki uzorak, negativna i pozitivna kontrola raspoređuju se pomoću pipete u razna polja kartice za aglutinaciju prema uputstvu proizvođača;

- kuglice lateksa dodaju se pipetom u svako polje kartice za aglutinaciju, prema uputstvu proizvođača, a da se ne dovedu u kontakt s uzorcima i kontrolama, a u svakom polju kuglice lateksa zatim se lagano miješaju štapićem za jednokratnu uporabu dok homogena tečnost ne prekrije cijelo polje;

- kartica za aglutinaciju stavlja se u trodimenzionalnu miješalicu i miješa tijekom 10 ± 1 minuta prema uputstvu proizvođača;

- nakon isteka vremena prema uputstvu proizvođača, miješanje se zaustavlja i kartica za aglutinaciju stavlja se na ravnu ploču i rezultati reakcije čitaju se odmah prema uputstvu proizvođača; ako je uzorak pozitivan, moraju se pojaviti agregati kuglica; ako je uzorak negativan, suspenzija ostaje homogena bez agregata kuglica.

3.2. Uzorci manji od 100 g

Za uzorke manje od 100 g mora se slijediti postupak utvrđen u potački 3.2 tačka 3 Dio 1 (3. 2. Uzorci manji od 100 g) ovog priloga.

3.3. Pozitivni ili sumnjivi rezultati

Kada pregled zbirnog uzorka da pozitivan ili sumnjiv rezultat, uzima se dodatni uzorak od 20 g od svake svinje u skladu sa alinejom 1 tačka 2 Dio 1 ove uredbe, a uzorci od po 20 g od pet svinja pregledaju se kao zbirni uzorak primjenom postupka iz podtačke 3.1 ove tačke i na ovaj način pregledaju se uzorci iz 20 grupa po pet svinja.

Kada se dobije pozitivna lateks aglutinacija u zbirnom uzroku od pet svinja, uzimaju se dodatni uzorci od 20 g od svake pojedinačne svinje iz te grupe i svaki od njih se posebno pregleda upotrebom metode iz ovog odjeljka.

Ako se dobije pozitivan ili nejasan rezultat lateks aglutinacije, najmanje 20 g mišića svinja mora se poslati nacionalnoj referentnoj laboratoriji radi potvrde pomoću jedne od metoda iz Dijela 1 ovog priloga.

Uzorci parazita čuvaju se u 90% etil-alkoholu u svrhu konzerviranja i identifikacije na nivou vrste u nacionalnoj referentnoj laboratoriji ili referentnoj laboratoriji Evropske unije.

Nakon sakupljanja parazita, pozitivne tečnosti moraju se dekontaminirati zagrijavanjem na najmanje 60°C .

3.4. Postupak čišćenja i dekontaminacije nakon pozitivnog ili sumnjivog rezultata

Ako se ispitivanjem zbirnog ili pojedinačnog uzorka dobije pozitivan ili sumnjiv rezultat lateks aglutinacije, svi materijali i predmeti u kontaktu sa mesom (posuda za miješanje i

oštrica, tučak, posuda, štapić za miješanje, senzor temperature, konični lijevak za filtraciju, sito i pincete) moraju se pažljivo dekontaminirati potapanjem nekoliko sekundi u vrućoj vodi (65 do 90°C).

Ostaci mesa ili neaktivne larve koje mogu ostati na njihovoj površini mogu se ukloniti čistim sunderom i vodom iz slavine.

Ako je potrebno, može se dodati nekoliko kapi deterdženta radi odmašćivanja opreme.

Svaki dio opreme detaljno se ispere radi uklanjanja tragova deterdženta.

Odeljak E

Test vještačke digestije za in vitro otkrivanje larvi *Trichinella* spp. u uzorcima mesa, PrioCHECK® Trichinella AAD Kit

Ova metoda smatra se ekvivalentnom samo za testiranje mesa domaćih svinja.

PrioCHECK® Trichinella AAD Kit upotrebljava se u skladu s uputstvom za upotrebu opreme pomoću lijevaka za odvajanje (Lenz NS 29/32) i staklenom epruvetom od 80 ml.

PRILOG 2

Ispitivanje na trihinelu ostalih životinja, osim domaćih svinja

Trupovi konja, divljih svinja i drugih uzgojenih ili divljih vrsta životinja prijemčivih na trihinelu ispituju se u skladu sa jednom od metoda vještačke digestije iz Priloga 1 ove uredbe, uz sljedeće promjene:

a) uzorci težine najmanje 10 g uzimaju se iz jezičnog ili žvakaćih mišića konja, a od divljih svinja iz prednje noge, jezika ili dijafragme;

b) u slučaju konja, kada ovi mišići nedostaju, uzima se veći uzorak mišićnog dijela dijafragme na prelazu u tetivasti dio, ovaj mišić mora se očistiti od vezivnog i masnog tkiva;

c) najmanje 5 g uzorka podvrgava se postupku vještačke digestije u skladu sa referentnom metodom ispitivanja iz Dijela 1 Prilog 1 ove uredbe ili u skladu sa ekvivalentnom metodom iz Dijela 2 Prilog 1 ove uredbe.

za svaku digestiju, ukupna težina mišića koji se ispituje ne smije biti veća od:

- 100 g u slučaju primjene metode iz Dijela 1 Prilog 1 ove uredbe i metoda iz odjeljka A i B Dio 2 Prilog 1 ove uredbe; i

- 35 g u slučaju metode odjeljka C Dio 2 Prilog 1 ove uredbe;

d) kada je rezultat pozitivan, uzima se dodatnih 50 g uzorka za ponovno nezavisno ispitivanje;

e) svo meso divljih životinja, osim divljih svinja, kao što su medvjedi, sisari mesojedi (uključujući morske sisare) i gmizavci, mora se ispitati uzimanjem 10 g uzorka mišića s predilekcionih mjesta, ili većeg uzorka ako takva mjesta nijesu dostupna;

f) trajanje vještačke digestije mora biti dovoljno da se obezbjedi odgovarajuća digestija tkiva konja, divljih svinja i drugih uzgojenih ili divljih vrsta životinja prijemčivih na trihinelu, ali digestija ne smije trajati duže od 60 minuta.

Predilekciona mjesta su kod:

- medvjeda: dijafragma, žvačni mišić i jezik;

- morževa: jezik;

- krokodila: žvačni mišić, krilasti mišić, i međurebreni mišići;

- ptica: mišići glave (npr. žvačni mišić i vratni mišići).

PRILOG 3

Postupci zamrzavanja

A. Metoda zamrzavanja 1

- 1) Meso koje se već dopremi zamrznuto ostavlja se u takvom stanju.
- 2) Tehnička oprema i napajanje rashladne prostorije energijom moraju biti takvi da obezbijavaju vrlo brzo postizanje i održavanje potrebne temperature u svim dijelovima prostorije i mesa.
- 3) Izolacijsko pakovanje se prije zamrzavanja mora odstraniti, osim u slučajevima kada je meso u potpunosti na potrebnoj temperaturi u trenutku unošenja u rashladnu prostoriju ili kada je meso pakovano tako da pakovanje ne sprječava postizanje potrebne temperature u određenom vremenu.
- 4) Pošiljke se u rashladnoj prostoriji moraju držati odvojeno, strogo pod ključem.
- 5) Mora se voditi evidencija o danu i vremenu prijema svake pošiljke u rashladnu prostoriju.
- 6) Temperatura rashladne prostorije mora biti najmanje – 25°C i mjeri se umjerenim termo-električnim instrumentima i trajno bilježiti.
Ne smije se mjeriti direktno u dotoku hladnog vazduha, a instrumenti se moraju držati pod ključem.
U temperaturne liste moraju da se unesu i relevantni podaci iz zapisnika o pregledu mesa kod uvoza i datum i vrijeme započinjanja i završetka zamrzavanja i moraju da se čuvaju godinu dana računajući od datuma završetka.
- 7) Meso prečnika ili debljine do 25 cm mora biti zamrznuto neprekidno najmanje 240 sati, a meso prečnika ili debljine između 25 i 50 cm mora biti zamrznuto neprekidno najmanje 480 sati.
Ovaj postupak zamrzavanja ne smije se primjenjivati na meso većeg prečnika ili debljine.
Vrijeme zamrzavanja počinje da se računa od trenutka kada temperatura u rashladnoj prostoriji dostigne temperaturu navedenu u podtački 6 ove tačke.

B. Metoda zamrzavanja 2

Primjenjuju se odredbe navedene u podtač. 1 do 5 tačke A ovog priloga (metoda zamrzavanja 1) uz primjenu sljedećih odnosa vremena i temperature:

- 1) meso prečnika ili debljine do 15 cm mora biti zamrznuto u skladu sa jednim od sljedećih odnosa vremena i temperature:
 - 20 dana pri – 15 °C;
 - 10 dana pri – 23 °C;
 - 6 dana pri – 29 °C;
- 2) meso prečnika ili debljine između 15 cm i 50 cm mora biti zamrznuto u skladu sa jednim od sljedećih odnosa vremena i temperature:
 - 30 dana pri – 15 °C;
 - 20 dana pri – 25 °C;
 - 12 dana pri – 29 °C.

Temperatura u rashladnoj prostoriji ne smije biti viša od nivoa odabrane temperature inaktivacije.

Ona se mora mjeriti baždarenim termo-električnim instrumentima i trajno bilježiti.

Ne smije se mjeriti direktno u dotoku hladnog vazduha.

Ovaj instrument mora se držati pod ključem.

U temperaturne liste moraju da se unesu i relevantni podaci iz zapisnika o pregledu mesa kod uvoza i datum i vrijeme započinjanja i završetka zamrzavanja i moraju da se čuvaju godinu dana računajući od datuma završetka.

Kada se koriste tuneli za zamrzavanje, a ne slijede se dosljedno gore opisani postupci, subjekt u poslovanju hranom mora dokazati službenom veterinaru da je alternativna metoda efikasna za uništavanje parazita *Trichinella* u svinjskom mesu.

C. Metoda zamrzavanja 3

Postupak se sastoji od komercijalnog suvog zamrzavanja ili zamrzavanja mesa uz određene odnose vremena i temperature, s tim da se temperatura kontroliše u središtu svakog komada mesa.

Primjenjuju se odredbe navedene u podtač. 1 do 5 tačke A ovog priloga (metoda zamrzavanja 1) uz primjenu sljedećih odnosa vremena i temperature:

- 106 sati pri – 18 °C,
- 82 sata pri – 21 °C,
- 63 sata pri – 23,5 °C,
- 48 sati pri – 26 °C,
- 35 sati pri – 29 °C,
- 22 sata pri – 32 °C,
- 8 sati pri – 35 °C,
- 1/2 sata pri – 37 °C.

Temperatura se mora mjeriti baždarenim termo-električnim instrumentima i trajno bilježiti.

Sonda termometra umetne se u sredinu odrezanog komada mesa koji ne smije biti tanji od najdebljeg komada mesa predviđenog za zamrzavanje.

Taj se komad mesa mora staviti na najnepovoljnije mjesto u rashladnoj prostoriji, koje nije u blizini opreme za hlađenje ili direktno u dotoku hladnog vazduha. Instrumenti se moraju držati pod ključem.

U temperaturne liste moraju da se unesu i relevantni podaci iz zapisnika o pregledu mesa kod uvoza i datum i vrijeme započinjanja i završetka zamrzavanja i moraju da se čuvaju godinu dana računajući od datuma završetka.

PRILOG 4

OBAVJEŠTAVANJE O SLUČAJEVIMA ODSUPANJA OD ISPITIVANJA MESA NA TRIHINELU

O slučajevima odstupanja od ispitivanja mesa na trihinelu Uprava obavještava Evropsku komisiju godišnje dostavljanjem izvještaja koji sadrži podatke o:

- broju slučajeva (uvezenih ili autohtonih) trihineloze kod ljudi, uključujući epidemiološke podatke;
- broju obavljenih testova i rezultatima ispitivanja na trihinelu kod domaćih svinja, divljih svinja, konja, divljači i drugih prijemčivih životinja;
- o testovima koji su izvršeni na trupovima svinja sa službeno priznatih gazdinstava, rasplodnih krmača, nerastova i svinja za tov.

**USLOVI KOJE TREBA DA ISPUNJAVAJU GAZDINSTVA ILI KOMPARTMENTA
ZA DOBIJANJE STATUSA GAZDINSTVA ILI KOMPARTMENTA SA
KONTROLISANIM DRŽANJEM SVINJA**

1. Status gazdinstva ili kompartmenta sa kontrolisanim držanjem svinja može da dobije gazdinstvo ili kompartment ako:

1) su preduzete sve mjere pri izgradnji i održavanjem objekta kako bi se spriječio pristup glodara i drugih vrsta sisara, ptica, mesojeda u objekte u kojima se drže životinje;

2) se za kontrolu štetočina a naročito glodara primjenjuje program kontrole na način kojim se sprječava zaraženost svinja i vodi evidencije o sprovođenju tog programa;

3) se sva hrana za životinje nabavlja iz objekta u kojem se proizvodi hrana za životinje u skladu sa propiom kojim je uređena higijena hrane za životinje;

4) se hrana za životinje koja je namijenjena za vrste prijemčive na trihinelu skladišti u zatvorenim silosima ili drugim spremnicima u koje ne mogu prodrijeti glodari, a sva ostala hrana za životinje se toplotno obrađuje ili proizvodi i skladištiti;

5) se uginule životinje skupljaju, označavaju i preveze bez u skladu sa propisima kojim su uređeni zahtjevi za nus proizvode životinjskog porijekla koji nijesu namjenjeni ishrani ljudi;

6) se vrši obilježavanje svinja kako bi se omogućila sledljivost svake životinje do gazdinstva iz kojeg potieče;

7) unosi na gazdinstvo samo domaće svinje koje potiču i dolaze iz gazdinstva koja imaju status gazdinstva sa kontrolisanim držanjem svinja;

8) se obezbijedi da nijedna domaća svinja nema pristup spoljnim objektima ili ako se na osnovu analize rizika dokaže da s obzirom na period, objekte i okolnosti spoljnog pristupa ne postoji opasnost od unosa trihinele u gazdinstvo;

9) nijedna svinja namijenjena za rasplod i proizvodnju, nije istovarena nakon napuštanja gazdinstva porijekla u sabirni centar, osim u sabirni centar koji ispunjava uslove za dobijanje statusa sa kontrolisanim držanjem svinja i ako sve domaće svinje koje se razvrstavaju u pošiljke u sabirnom centru potiču i dolaze iz gazdinstava ili kompartmenta sa statusom kontrolisanog držanja svinja.

2. Gazdinstva ili kompartmenti koji imaju status gazdinstva ili kompartmenta sa kontrolisanim držanjem svinja kontroliše službeni veterinar u skladu sa planom službenih kontrola, a učestalost kontrola određuje se na osnovu procjene rizika, uzimajući u obzir istoriju bolesti i prevalencu, prethodne nalaze, geografsko područje, prijemčive životinjske vrste na tom području, način držanja životinja, veterinarski nadzor i postupanja držaoca svinja, kao i podatke o ispitivanju domaćih svinja sa tih gazdinstava na trihinelu u skladu sa članom 4 st. 1 i 2 ove uredbe.