

Wyniki badań biegłości (PT) w kierunku włośni w 2014 r.

EWA CHMURZYŃSKA, MIROSLAW RÓŻYCKI, EWA BILSKA-ZAJĄC,
JACEK KARAMON, TOMASZ CENCEK

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 20.07.2015

Zaakceptowano 22.09.2015

Chmurzyńska E., Różycki M., Bilaska-Zajac E., Karamon J., Cencek T.

Results of proficiency testing (PT) for *Trichinella* in 2014

Summary

The aim of this article is to present and analyze the obtained PT results for the last year (i.e. 2014). The material for PT was the properly minced pork meat (or horse meat for horse slaughterhouses) spiked with *Trichinella* larvae. Live *Trichinella* larvae were obtained during the digestion process. Meat samples weighting 50 g were spiked under microscopic control with a known number of larvae preserved with gelatin gels of the appropriate concentration.

In 2014 over 250 laboratories routinely examining pig meat took part in PT. On the level of 5 larvae 4 laboratories obtained doubtful results and were 9 + inconsistent in quantitative analysis. The average value of the z-scores was 0.84. The qualitative assessment of PT results on the level of contamination 3, 5 larvae and negative (blank) samples showed 21, 9 and 4 of unsatisfactory results. At the limit of detection – 1 larva per sample – positive results were obtained by 87.8% of laboratories. In the same year 14 laboratories testing horse meat participated in PT – all of them obtained consistent results. The average value of the z-score was 0.88.

In a study in 2014 257 laboratories participated. This is comparable to the number of participants relative to the years 2012 and 2013. The quantitative assessment average z-score was 0.84 and it was lower than in previous years (which means better). The percentage of consistent results in qualitative research in previous years (2009–2011) was a bit higher and ranged from 91.6% to almost 95%. In 2014 the quality of PT has not deteriorated compared to previous years despite a three times smaller number of larvae in samples. It should be emphasized that the organization of the PT scheme permitted additionally assessing the laboratories by examination of the samples at the limit of detection of the method.

Keywords: *Trichinella*, proficiency testing (PT), magnetic stirrer method

Włośnica (*trichinellosis*) jest niebezpieczną pasożytniczą odzwierzęcą wywołaną przez nicienie z rodzaju *Trichinella*. Zażycie włośnicami bywa przyczyną ciężkich zachorowań prowadzących do groźnych powikłań, a nawet śmierci. Ludzie zarażają się, spożywając niepoddane wystarczającej obróbce cieplnej mięso (głównie dzików i świń), zawierające żywe larwy tych nicieni. W przeszłości pasożytność ta występowała u świń dość często (5). Od lat 90. XX w. dzięki działaniom IW i poprawie jakości higieny produkcji świń inwazja ta spotykana była coraz rzadziej. W ostatnich 2 latach ponownie jednak nastąpił wzrost przypadków włośnicy świń. Odwrotnie natomiast u dzików, w związku ze znacznym zwiększeniem się populacji tych zwierząt, od szeregu lat obserwuje się wzrost ekstensywności inwazji włośni. Sytuacja taka stwarza ciągłe zagrożenie dla konsumentów mięsa. W celu minimalizacji tego zagrożenia w Polsce każda tusza ubijanych świń, koni i nutrii, jak również każdy odstrzelony dzik podlegają obowiązkowemu badaniu w kierunku obecności włośni (6, 8). Badania takie wy-

konywane są w naszym kraju bardzo czułą metodą wytrawiania wspomaganego mieszadłem magnetycznym, a badania metodą kompresorową dopuszczalne są tylko w wyjątkowych przypadkach. Granica wykrywalności przy wytrawianiu próbki o masie 100 g wynosi 1 larwę. Badania w kierunku włośnicy wykonywane są przez lekarzy wyznaczonych przez PLW (wg danych GIW stan na dzień 6 marca 2013 r. wynosił 1762 wyznaczonych lekarzy). Dzięki ich pracy w ciągu ostatnich 15 lat nie wystąpiło ani jedno ognisko zarażenia włośnicą, którego przyczyną byłoby spożycie mięsa badanego metodą wytrawiania. Mimo licznej rzeszy lekarzy badających mięso w laboratoriach znajdujących się w różnych lokalizacjach, sporadycznie spotykamy się z problemem utrzymania jednakowego, wysokiego poziomu wykonywanych badań. Liczbę i lokalizację laboratoriów przedstawia tab. 1 (na podstawie danych GIW 2014 r.).

Istotnym czynnikiem pozwalającym na utrzymanie wysokiego poziomu badań było wdrożenie w laboratoriach systemu zarządzania jakością badań i akre-

Tab. 1. Liczba laboratoriów badających mięso na obecność włośni w poszczególnych województwach w Polsce (na podstawie danych GIW 2014 r.).

Województwo	Laboratoria badające mięso na obecność włośni – lokalizacja									
	Rzeźnie ogółem	Rzeźnie*	Zakłady przetwórstwa dziczyzny ogółem	Zakłady przetwórstwa dziczyzny*	ZHW ogółem	ZHW*	PIW ogółem	PIW*	Lecznice ogółem	Lecznice*
Dolnośląskie	9	9	1	1	1	1				
Kujawsko-pomorskie	13	11	1	1	1	1	7	7	39	4
Lubelskie	28	27	1	1	1	1	1	0	4	0
Lubuskie	4	1	2	0	2	2	4	3	3	0
Łódzkie	71	40			1	1	9	9	8	5
Małopolskie	37	37			1	1	3	0	3	0
Mazowieckie	54	27	1	0	3	3	4	3	4	1
Opolskie	24	24	1	1	1	1	1	1	9	0
Podkarpackie	39	39	1	1	3	3	0	0	1	0
Podlaskie	24	24	0	0	1	1	1	1	5	4
Pomorskie	5	5			1	1	9	9	2	2
Śląskie	42	36	0	0	0	0	4	1	15	0
Świętokrzyskie	30	30			1	1	9	0	0	0
Warmińsko-mazurskie	17	16	1	1	1	1	5	2	21	2
Wielkopolskie	62	45	0	0	1	1	13	13	47	0
Zachodniopomorskie	13	13	1	1	1	1	8	8	6	6
Razem	472	384	10	7	20	20	78	57	167	24

Objaśnienia: * – laboratoria akredytowane

dytacja. Liczbę laboratoriów poszczególnych typów posiadających akredytację podano w tab. 2.

W realizacji tych założeń niebagatelną rolę odegrało Krajowe Laboratorium Referencyjne ds. włośnicy (KLR), zlokalizowane w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego (PIWet – PIB) (7). W ramach swojej działalności KLR już od ponad 10 lat organizuje badania biegłości (Proficiency Test – PT) dla laboratoriów badających mięso na włośnicę. Celem programu międzylaboratoryjnych badań biegłości laboratoriów diagnostyki włośnicy w kierunku wykrywania włośni w mięsie metodą wytrawiania wspomaganego mieszczałem magnetycznym jest stworzenie możliwości potwierdzenia kompetencji laboratoriów wykonujących te badania (3). Początkowo PT obejmowały swoim zasięgiem niewielką liczbę

Tab. 2. Liczba laboratoriów akredytowanych badające mięso na obecność włośni (na podstawie danych GIW 2014 r.)

Laboratoria badające mięso na obecność włośni	Ogółem	Akredytowane	%
Rzeźnie	472	384	81%
Przetwórstwo	10	7	70%
ZHW	20	20	100%
PIW	78	57	73%
Lecznice	167	24	14%
Razem	747	492	

pracowni wytrawiania (około 30-50). Ocena uzyskanych wyników była tylko jakościowa. Od 2007 r. do 2013 r. badania PT były organizowane dla laboratoriów ze wszystkich województw w Polsce.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie i analiza uzyskanych wyników badań PT w ostatnim (2014) roku.

Organizacja badań PT. W 2014 r. międzylaboratoryjne badania biegłości PT zostały zorganizowane i zrealizowane w oparciu o wytyczne zawarte w normie PN-EN ISO/IEC 17043:2011. „Ocena zgodności – Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości” (4) oraz zatwierdzony przez Polskie Centrum Akredytacji program porównań międzylaboratoryjnych. Były one dedykowane dla województw: wielkopolskiego, dolnośląskiego, podlaskiego, lubelskiego, lubuskiego, opolskiego, pomorskiego i łódzkiego. Do badań PT (matryca: mięso wieprzowe) w 2014 r. zostało zgłoszonych 267 laboratoriów. Ostatecznie udział wzięło 257 laboratoriów z województw: dolnośląskiego, lubelskiego, lubuskiego, podlaskiego, pomorskiego, wielkopolskiego. W 2014 r. przeprowadzono również badanie PT wśród 14 laboratoriów badających mięso końskie lub takich, które mają ten gatunek mięsa w swoim zakresie akredytacji. Zgłoszenie uczestnictwa w programie następowało poprzez przekazanie listy laboratoriów z danego województwa przez wojewódzkich koordynatorów. Z koordynatorem wojewódzkim był również uzgodniony termin przesyłania próbek. Po

otrzymaniu zgłoszenia – listy laboratoriów organizator nadawał laboratoriom zgłoszonym do udziału w badaniach biegłości poufny indywidualny numer identyfikacyjny laboratorium (kod laboratorium), pod którym przedstawiane były wyniki badań. Każde laboratorium otrzymało komplet próbek wraz z adresem strony internetowej, loginem i hasłem. Informacje dotyczące metodyki wprowadzania, przesyłania wyników badań były zawarte na stronie internetowej, a dostęp do nich – możliwy po uprzednim zalogowaniu. Otrzymane przez uczestników próbki do badania nie wymagały żadnych dodatkowych czynności poza rutynowo wykonywanymi w laboratorium, a tym samym nie wprowadzały dodatkowych źródeł błędów. Laboratoria były zobligowane do wykonania oznaczenia w ciągu 5 dni roboczych od otrzymania próbek przez wojewódzkiego koordynatora i przesłaniu do organizatora wyników badania w ciągu 8 dni od otrzymania próbek przez wojewódzkiego koordynatora za pomocą formularza znajdującego się na stronie http://www.piwet.pulawy.pl/pt_wlosnie2014. Podobnie jak w latach ubiegłych, tożsamość i oceny poszczególnych laboratoriów były poufne i podawane w ogólnym opracowaniu w zakodowanej postaci. Każde laboratorium otrzymało indywidualny numer identyfikacyjny, umożliwiający odnalezienie swoich rezultatów. Uczestnicy otrzymali również ocenę badań jakościowych automatycznie po ich wpisaniu i zatwierdzeniu wyników badań. Pełne sprawozdania z badań PT otrzymali koordynatorzy. Sprawozdania z badań biegłości wraz z odkodowaną listą laboratoriów zostały również przekazane do Głównego Lekarza Weterynarii oraz Departamentu Bezpieczeństwa Żywności i Weterynarii Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Materiał i metody

Przygotowanie próbek. Jako materiał testowy stosowano odpowiednio rozdrobnione mięso wieprzowe lub końskie, do którego dodano larw włośni. Żywe larwy włośni otrzymane w procesie wytrawiania zgodnie z procedurą badawczą ZP/PB – 44, były umieszczane pod mikroskopem w określonej liczbie w studzienkach żelatynowych i zalewane żelatyną o odpowiednim stężeniu, a następnie dodawane do wieprzowego mięsa mielonego o masie 50 g. W ten sposób przygotowane próbki umieszczano w opakowaniach docelowych – pudełkach plastikowych, które wcześniej odpowiednio oznakowano. Przed wysłaniem oceniono jednorodność materiału testowego dla losowo wybranych próbek z partii materiału przygotowanego do badania biegłości.

Kryteria oceny badań PT. Ocena badań PT w 2014 r. składała się z trzech elementów: oceny ilościowej, jakościowej oraz oceny sprawności systemu badań w województwie. Do oceny ilościowej wykorzystano próbki zawierające 5 larw włośni. Do oceny jakościowej zastosowano próbki kontaminowane żywymi larwami włośni na poziomach kontaminacji 0, 3 i 5 larw, natomiast do oceny systemu badań w województwie wykorzystano próbki zawierające 1 larwę. Na standardową procedurę oceny raportowanych

przez uczestników wyników ilościowych składało się wyznaczenie wartości przypisanej, obliczenie statystycznych wskaźników charakteryzujących uzyskane rezultaty oraz ocena osiągniętych rezultatów. Wartości parametrów niezbędnych w statystyce badania biegłości wyznaczono w oparciu o zastosowanie metod statystycznych, zgodnych z wytycznymi Normy ISO/IEC 17043: 2011, która zastąpiła przewodniki ISO/IEC Guide 43-1:1997 i ISO/IEC Guide 43-2:1997. Jako kryterium oceny wyników badań ilościowych przyjęto wskaźnik z-score dla próbek kontaminowanych na poziomie 5 larw, obliczany ze wzoru $z = \frac{x - X}{\sigma}$, gdzie x – oznacza wynik laboratorium, a X – liczbę larw umieszczonych w próbkach kontaminowanych, σ – odchylenie standardowe oceny biegłości.

Laboratoria zostały ocenione według następującego schematu: wyniki uzyskane przez laboratoria, dla których wartość wskaźnika z mieściła się w przedziale wartości bezwzględnych ≤ 2 , uznawane były za zadowalające, w przedziale $2 < |z| < 3$ za wątpliwe, pozostałe zaś za niezadowalające.

Zgodnie z zaleceniami Laboratorium Referencyjnego Unii Europejskiej (EURL), wyniki fałszywie ujemne uznano za niezadowalające pomimo uzyskania wartości wskaźnika $|z|$ nieprzekraczającego $|z| \geq 3$ (2).

Dla laboratoriów ujętych w Systemie Zarządzania Jakością (SZJ) w danym województwie przyjęto następujące zalecenia interpretacji wyników badań PT: gdy wartość wskaźnika z-score wynosi powyżej 3,0 lub poniżej -3,0, należy rozpatrywać to jako sygnał wskazujący na konieczność podjęcia działań mających na celu szczegółową analizę przypadku i podjęcie działań korygujących.

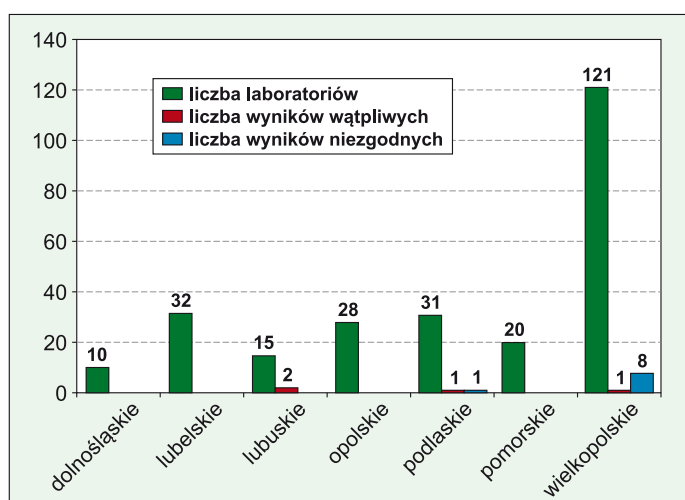
Wartość wskaźnika $2 < |z| < 3$ powinna być rozpatrywana jako sygnał ostrzegawczy. Pojedynczy sygnał działania powinien być rozpatrywany jako informacja o wystąpieniu anomalii wymagającej szczegółowej analizy. Sygnały ostrzegawcze w dwóch kolejnych rundach badań biegłości powinny być rozpatrywane jako informacja o wystąpieniu anomalii wymagającej szczegółowej analizy i podjęcia działań korygujących.

Dodatkowo zamieszczono ocenę dla badania jako metody jakościowej. Jak już wspomniano, wyniki badań uzyskane przez laboratoria zostały ocenione jakościowo zgodnie z zasadą, że wynik uznaje się za zgodny w przypadku znalezienia larw włośni w próbkach kontaminowanych. Wynikiem zgodnym jest również nie wykrycie larw włośni w próbce ślepej. Za wyniki niezgodne uznaje się wyniki badań, w których nie wykryto larw włośni w próbkach kontaminowanych lub wykryto larwy w próbkach ślepych.

Ocena systemu badań w województwie opiera się na porównaniu odsetka wyników zgodnych na poziomie detekcji (1 larwa) z wynikami pierwotnej walidacji metody (1). Uzyskanie $\geq 75\%$ wyników zgodnych na tym poziomie świadczy o sprawnie działającym systemie badań na włośnię. Wynik $< 75\%$ należy traktować jako sygnał do podjęcia analizy i działań zapobiegawczych.

Zgodnie z pismem GLW z dn. 09.04.2013 r. odnośnie do oceny na niskim poziomie uzyskanie wyniku niezgodnego w próbce kontaminowanej na poziomie jednej larwy powinno być rozpatrywane jako sygnał ostrzegawczy. Po uzyskaniu dwóch wyników niezgodnych na tym poziomie

ZHW musi podjąć działania korygujące, a w przypadku uzyskania trzeciego w kolejności wyniku niezgodnego – działania mające na celu zawieszenie działalności laboratorium do czasu usunięcia przyczyn niezgodności.



Ryc. 1. Graficzne przedstawienie wyników badania biegłości – ocena ilościowa

Wyniki i omówienie

Wyniki badania ilościowego PT przedstawiono na ryc. 1 i 2.

Jak wynika z przedstawionych danych, liczba wyników wątpliwych wyniosła 4, co stanowiło 1,55% zbadanych próbek na poziomie 5 larw, zaś wyników niezgodnych 9, co stanowiło 3,5%. Średnia wartość z-score uzyskana w tych badaniach wyniosła 0,84.

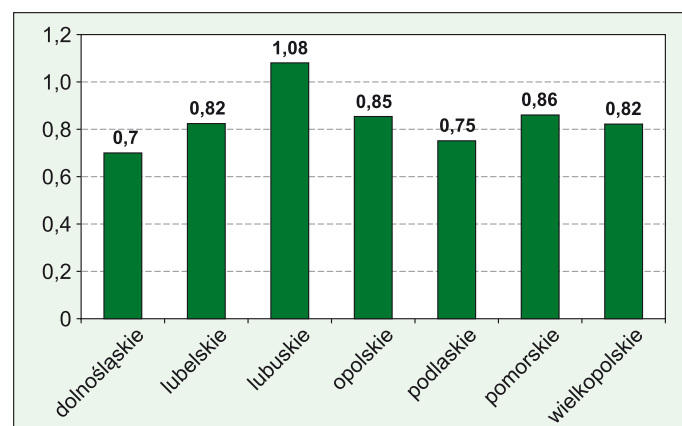
Po dokonaniu oceny ilościowej 14 laboratoriów badających mięso końskie nie odnotowano wyników wątpliwych i niezgodnych. Średnia wartość wskaźnika z-score wyniosła 0,88.

Wyniki oceny jakościowej uzyskane przez laboratoria biorące udział w PT na włośnię w 2014 r. na poziomie kontaminacji 3, 5 larw i w próbkach ślepych przedstawiono na ryc. 3.

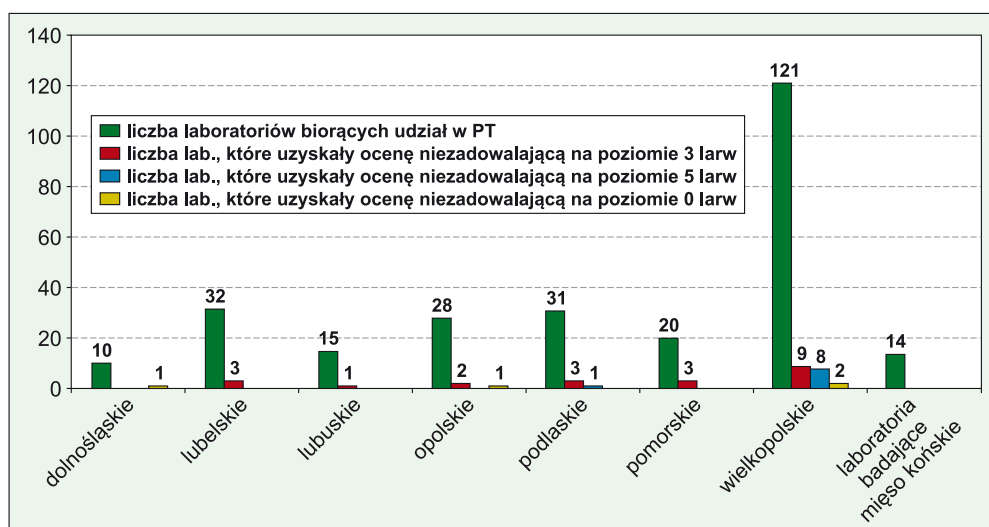
Ocena jakościowa wyników badania próbek zawierających 3, 5 larw i próbek ślepych wykazała, odpowiednio, 21 wyników niezadowolających, co stanowi 7,7%; 9 wyników niezadowolających na poziomie zarażenia 5 larw, co stanowi 3,32% i 4 wyniki niezadowolające w próbkach ślepych (1,47%).

Ocena systemu badań w poszczególnych województwach została przeprowadzona na podstawie analizy wyników badania próbek na poziomie limitu detekcji metody. Odsetek próbek, w których wykryto larwy na tym poziomie kontaminacji, przedstawiono na ryc. 4.

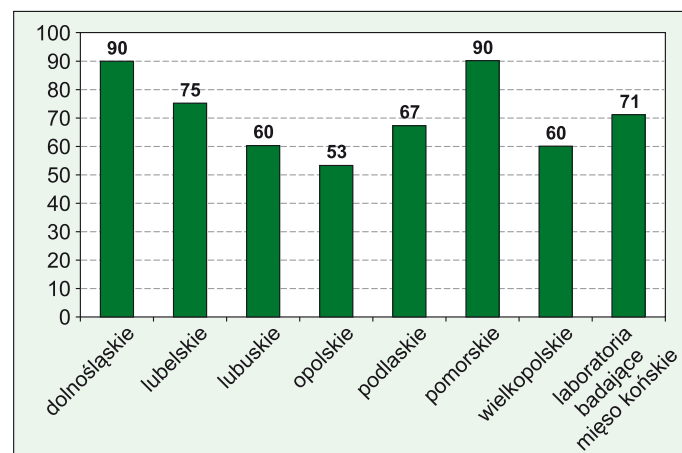
Wyniki zgodne w ocenie jakościowej na poziomie detekcji – 1 larwa – uzyskało 238 laboratoriów (87,8%). Wyniki uzyskane na tym poziomie kontaminacji w województwach: dolnośląskim, lubelskim, pomorskim potwierdzają prawidłowość prowadzonych badań, ponieważ laboratoria te spełniły wymóg pierwotnej walidacji metody (wykrywalność $\geq 75\%$ uznaje się za zadowalającą). Jak wynika z przedsta-



Ryc. 2. Graficzne przedstawienie wyników badania biegłości – średnia wartość z-score w poszczególnych województwach



Ryc. 3. Graficzne przedstawienie wyników badania biegłości – ocena jakościowa



Ryc. 4. Graficzne przedstawienie wyników badania biegłości – % wyników prawidłowych na poziomie detekcji metody – 1 larwa

wionych danych, wyniki uzyskane w województwach: lubuskim, opolskim, podlaskim, wielkopolskim, jak również w laboratoriach badających mięso końskie wskazują na konieczność podjęcia działań systemowych w zakresie badania mięsa na włośnię. Uzyskany wynik 71% bliski założeniom walidacyjnym świadczy jednak o niewielkich niedociągnięciach w jakości wykonywanych badań, jakkolwiek stosunkowo mała liczba laboratoriów biorących udział w tym badaniu może wpływać na dużą przypadkowość tego wyniku.

W badaniach PT w 2014 r. wzięło udział 257 laboratoriów. Jest to porównywalna liczba uczestników w stosunku do lat 2012 i 2013, tj. do okresu, w którym corocznymi badaniami PT obejmowana była połowa województw w kraju.

W ocenie ilościowej uzyskany średni z-score wyniósł 0,84 i był niższy niż w latach poprzednich. Godne uwagi jest, że współczynnik ten wskazuje na wyższą jakość wykonywanych badań przez laboratoria polskie niż inne działające na tym polu w Europie. Przykładowo: średni z-score w latach 2009-2011 wyniósł dla Polski 0,93, dla Czech 2,24, a dla Szwecji 2,38.

Należy zauważyć, że odsetek wyników zgodnych w badaniach jakościowych w poprzednich latach (2009-2011) był nieco wyższy i wahał się od 91,6% do prawie 95%. Mając jednak na uwadze, że w latach ubiegłych badania te były prowadzone z użyciem próbek kontaminowanych nawet 3-krotnie większą liczbą larw, można stwierdzić, że jakość wykonywanych badań nie uległa pogorszeniu. Świadczy o tym również wyższy odsetek uzyskanych w roku bieżącym wyników zgodnych w badaniu próbek kontaminowanych na poziomie 1 larwy niż w 2013 r., dokładne porównania tego parametru będą możliwe jednak dopiero po zebraniu danych z kilku lat.

Zastosowany schemat organizacji badań PT umożliwił ocenę laboratoriów badających mięso w kierunku wykrycia larw włośni, a także pozwolił uczestnikom na porównanie wyników własnego laboratorium z pozostałymi. Jednocześnie w przypadku uzyskania wyników wątpliwych lub niezgodnych pozwolił koordynatorom wojewódzkim na podjęcie odpowiednich działań zapobiegawczych lub korygujących. Prowadzone badania PT stanowią podstawowy element potwierdzenia kompetencji wymagany przez PCA w procesie utrzymania i rozszerzenia zakresu akredytacji.

Piśmiennictwo

1. Forbes L. B., Gajadhar A. A.: A validated Trichinella digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. *J. Food Prot.*, 1992, 62, 1308-1313.
2. International Commission on Trichinellosis 2012. Recommendations for Quality Assurance in Proficiency Testing. Recommendations for Quality Assurance in Digestion Testing Programs for Trichinella, Part 3, s. 1-9.
3. PN-EN ISO/IEC 17025. Ogólne wymagania dotyczące laboratoriów badawczych i wzorujących.
4. PN-EN ISO/IEC 17043:2011. Ocena zgodności. Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości.
5. Pozio E.: Searching for Trichinella: not all pigs are created equal. *Trends Parasitol.* 2014, 30, 4-10.
6. Rozporządzenia Komisji (WE) NR 2075/2005 z dnia 5 grudnia 2005 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące urzędowych kontroli w odniesieniu do włośieni (Trichinella) w mięsie.
7. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 18 kwietnia 2012 r. sprawie krajowych laboratoriów referencyjnych. *Dz.U.* z 2014 r., poz. 256 z późn. zm.
8. Rozporządzenie (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt. *Dz. U. UE L 191/1* z 30.04.2004.

Adres autora: lek. wet. Ewa Chmurzyńska, Państwowy Instytut Weterynaryjny – PIB, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: ewa.chmurzynska@piwet.pulawy.pl