

Results of the proficiency program testing, in terms of meat investigation for *Trichinella* with artificial digestion method in Wielkopolska Province collaborative trials in 2016

Różycki M., Chmurzyńska E., Bilka-Zajac E., Karamon J., Sroka J., Gradziel-Krukowska K., Antolak E., Próchniak M., Cencek T., Department of Parasitology and Parasitic Diseases, National Veterinary Research Institute in Pulawy

The aim of this article was to present results of collaborative proficiency testing among laboratories performing investigations for trichinosis. Trichinosis in humans is caused by the parasitic roundworm *Trichinella spiralis*, due to the eating raw or undercooked meat of infected domestic or game animals. Investigation of fresh pork meat for trichinosis is among obligatory control measures. Trichinoscopy is routinely performed with the magnetic stirrer digestion method recognized as an effective tool for diagnostic procedure. The method is accepted as the international reference method and is based on enzymatic digestion of muscle tissue in an artificial digestion fluid prepared with pepsin and hydrochloric acid. Test sensitivity of the method is greatly influenced by the sample size, the kind of examined muscle and obviously – the personnel skills. All personnel involved in the examination of samples should participate in a quality control programs and a regular assessment of the testing, recording and analysis procedures used in the laboratory should be performed. Proficiency testing is an established instrument for quality assurance. It is also a proof for the laboratory competence. In this article we have presented results of proficiency testing organized by Polish National Reference Laboratory for 115 field laboratories in Greater Poland, endemic for *Trichinella* spp. During year 2016, in these collaborative trials 460 PT samples were examined and 26 laboratories failed examination (22.6%). In comparison to 2014, when 121 laboratories participated and 19 of them have failed (15.7%), the decrease in proficiency testing was found.

Keywords: meat examination, *Trichinella*., proficiency testing, collaborative trials.

Ogniska włośnicy pojawiające się w Polsce każdego roku u zwierząt stanowią realne zagrożenie dla konsumentów. Sytuacja taka budzi niepokój Inspekcji Weterynaryjnej. Zakażenie włośnicami bywa przyczyną ciężkich zachorowań prowadzących do groźnych powikłań, a nawet śmierci ludzi. Najbardziej efektywną metodą zapobiegania wystąpieniu choroby jest zapewnienie bezpiecznej żywności dla konsumentów. Zadanie to należy do lekarzy weterynarii, którzy w jego ramach wykonują badania mięsa w celu diagnostyki włośnicy. Należy podkreślić, że dzięki ich odpowiedzialnej pracy w ciągu

Wyniki międzylaboratoryjnych badań biegłości laboratoriów badających mięso na obecność włośni metodą wytrawiania w województwie wielkopolskim w 2016 r.

Mirosław Różycki, Ewa Chmurzyńska, Ewa Bilka-Zajac, Jacek Karamon, Jacek Sroka, Katarzyna Gradziel-Krukowska, Ewelina Antolak, Marek Próchniak, Tomasz Cencek

z Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

ostatnich 12 lat nie wystąpiło ani jedno ognisko zakażenia włośnicą ludzi, którego przyczyną byłoby spożycie mięsa badanego metodą wytrawiania. Zakłady Higieny Weterynaryjnej i powiatowi lekarze weterynarii, nie szczczędzą trudu, aby zapewnić odpowiednią jakość badań. Jednym z podstawowych elementów sterowania jakością i potwierdzania kompetencji lekarzy wykonujących to badanie jest udział w badaniach biegłości (proficiency testing – PT). Celem badania biegłości jest ocena jakości systemu badań i kompetencji laboratoriów prowadzących badanie mięsa surowego na obecność włośni metodą wytrawiania próbki zbiorczej z zastosowaniem magnetycznego mieszanina. Organizatorem takiego programu jest Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Krajowe Laboratorium Referencyjne ds. Włośnicy zlokalizowane w Zakładzie Parazytologii i Chorób Inwazyjnych. Organizator, jako Krajowe Laboratorium Referencyjne, na mocy rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady nr 882/2004/WE, rozporządzenia wykonawczego Komisji (WE) 1375/2015 oraz ustawy z 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej, jest zobowiązany do organizacji badań porównawczych pomiędzy krajowymi laboratoriami urzędowymi i zapewnienia odpowiedniego późniejszego zastosowania wyników takich badań (1, 2, 3). W tym artykule zostaną przedstawione wyniki porównań międzylaboratoryjnych w województwie wielkopolskim uznawanym za jeden z rejonów endemicznego występowania włośnicy.

Materiał i metody

Badania międzylaboratoryjne zostały zorganizowane w oparciu o wytyczne zawarte w normie PN-EN ISO/IEC 17043:2011 Ocena zgodności – Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości

(4). Organizator posiada akredytację systemu zarządzania na zgodność z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005 o numerze AB 1090 (5). Zgodnie z przyjętymi założeniami w każdym z województw działa wyznaczony przez wojewódzkiego lekarza weterynarii koordynator, który współpracuje z Krajowym Laboratorium Referencyjnym w zakresie ustalania terminu przesyłania oraz sposobu dostarczenia przygotowanych próbek. Uczestnicy są zobligowani do wykonania badań w ciągu pięciu dni od chwili dostarczenia próbek do laboratorium. Każdy z uczestników badań otrzymuje własne hasło i login dostępu do strony www.piwet.pulawy.pl/pt/wlosnie_2016.htm (6). Metodyka badań oraz zasady przesyłania wyników znajdują się na tej samej stronie.

Matrycą użytą do badań biegłości było zmielone mięso wieprzowe. Próbkę mięsa o masie 50 g były kontaminowane żywymi larwami włośni, w różnej liczbie (0, 1, 3, 5). Następnie z przygotowanych próbek tworzono zestawy po cztery próbki, każda na innym poziomie kontaminacji. Każde laboratorium uczestniczące w badaniach biegłości otrzymywało jeden zestaw próbek.

W 2016 r. badania biegłości składały się z trzech elementów: oceny jakościowej i ilościowej oraz oceny jakości systemu badań w województwie. Do oceny jakościowej wykorzystano próbki na poziomach kontaminacji 0, 3 i 5 larw. Sposób oceny ilościowej zmienił się w stosunku do lat ubiegłych i zgodnie z wytycznymi EURL do oceny ilościowej wykorzystano próbki zawierające 5 larw włośni. Do badań biegłości przygotowano również próbki zawierające 1 larwę, które posłużyły do oceny jakości systemu badań w województwie i nie były brane pod uwagę przy ocenie pojedynczych laboratoriów. Z partii materiału przygotowanego do badania biegłości, po jego zapakowaniu w docelowe

opakowania i przed wysłaniem do uczestników badań, wykonano także badania jednorodności materiału testowego dla losowo wybranych próbek. Otrzymane przez uczestników próbki do badania nie wymagały żadnych dodatkowych czynności poza rutynowo wykonywanymi w laboratorium, a tym samym nie wprowadzały dodatkowych źródeł błędów.

Wojewódzki koordynator zgłosił do badań biegłości 118 laboratoriów. Tożsamość i ocena poszczególnych laboratoriów były poufne i podane w ogólnym opracowaniu w postaci zakodowanej. Każde laboratorium otrzymało swój numer identyfikacyjny, umożliwiając odnalezienie swoich rezultatów. Uczestniczące laboratoria zostały oznaczone kodami od nr ii_0099 do ii_0216. Każde z uczestniczących laboratoriów zobligowane było do nadesłania uzyskanych wyników badań biegłości poprzez stronę internetową. Po dokonaniu interpretacji zebranych wyników od wszystkich uczestników, Krajowe Laboratorium Referencyjne przygotowało sprawozdanie z badań biegłości, które zostało przesłane do Głównego Lekarza Weterynarii oraz Departamentu Bezpieczeństwa Żywności i Weterynarii Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi wraz z odkodowaną listą laboratoriów.

Kryteria oceny wyników

Ocena jakościowa

Prawidłowość wyników jakościowych określano poprzez zgodność uzyskanego wyniku dodatniego lub ujemnego z wynikami oczekiwanymi.

Wynik badania jakościowego uznawano za:

- a) zgodny – w przypadku znalezienia larw włośni w próbkach kontaminowanych i niewykrycia larw włośni w próbce ślepej,
- b) niezgodny – w przypadku niewykrycia larw włośni w próbkach kontaminowanych,
- c) niezgodny – w przypadku wykrycia larw włośni w próbce ślepej.

Ocena ilościowa

Jako kryterium oceny obliczana jest wartość bezwzględna Delta $|\Delta|$, według wzoru:

$$|\Delta| = X_{lab} - X_{ref}$$

gdzie: x_{lab} – liczba larw wykrytych przez laboratorium, a X_{ref} – wartość przypisana.

Wartość przypisana to liczba larw dodanych do matrycy. Wynik badania ilościowego uznaje się za:

- a) zadowalający – w przypadku wartości $|\Delta| < 3,0$,

b) wątpliwy – w przypadku wartości $|\Delta| = 3,0$,

b) niezadowalający – w przypadku wartości $|\Delta| > 3,0$

Ocena jakości systemu badań

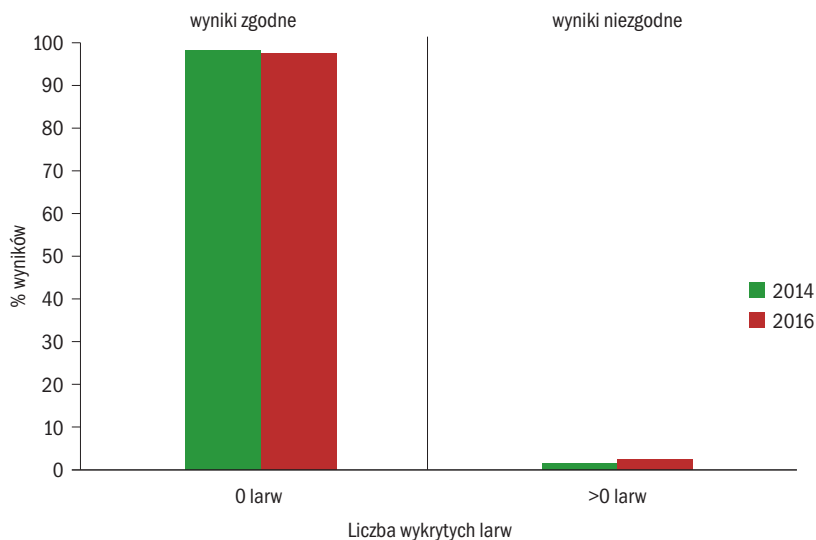
Ocena jakości systemu badań została przeprowadzona na podstawie wyników analiz

próbek na poziomie limitu detekcji metody (1 larwa). Przy tej ocenie przyjęto założenia walidacji metody wskazujące na prawidłowość prowadzonych badań, gdy 75% laboratoriów jest w stanie wykryć włośnię w próbkach na poziomie limitu detekcji metody. Ze względu na przypadkowość oceny wyników na poziomie detekcji metody wyniki te nie są

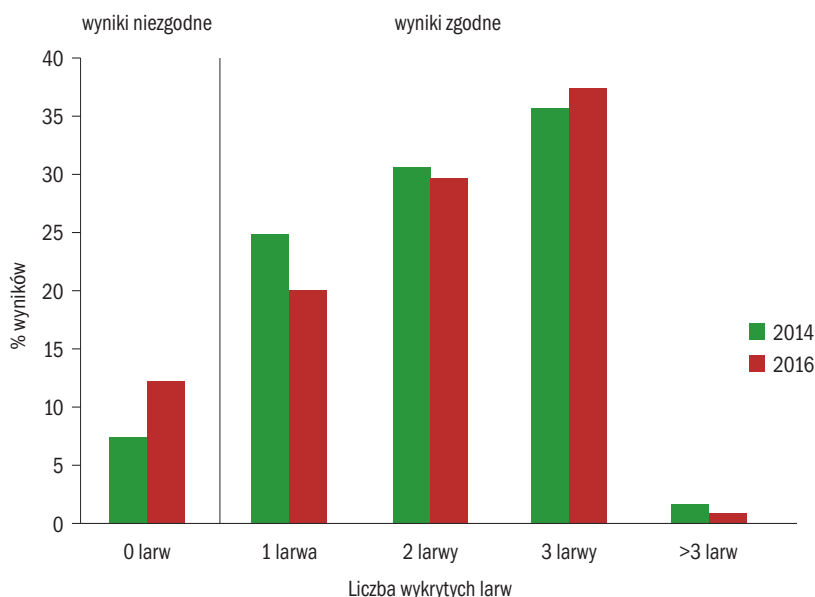
Tabela 1. Laboratoria, które uzyskały wyniki niezgodne, niezadowalające lub wątpliwe w 2016 r.

Lp.	Kod laboratorium	Poziom 0		Poziom 3		Poziom 5		Δ
		Kod próbki		Kod próbki		Kod próbki		
1.	ii_0110	635	0	943	0	731	3	2,0
2.	ii_0120	259	0	325	2	313	2	3,0
3.	ii_0121	274	0	467	2	667	2	3,0
4.	ii_0122	503	2	851	1	917	4	1,0
5.	ii_0124	198	0	593	3	135	1	4,0
6.	ii_0131	695	0	749	3	893	0	5,0
7.	ii_0135	38	0	629	3	475	1	4,0
8.	ii_0137	864	0	731	0	568	0	5,0
9.	ii_0138	791	0	80	3	486	1	4,0
10.	ii_0139	957	0	379	0	898	3	2,0
11.	ii_0142	168	0	945	0	206	3	2,0
12.	ii_0143	617	0	680	1	571	2	3,0
13.	ii_0144	88	0	163	2	951	3	2,0
14.	ii_0145	428	0	520	1	219	2	3,0
15.	ii_0149	244	0	519	0	412	2	3,0
16.	ii_0151	39	1	529	1	127	1	4,0
17.	ii_0154	199	7	910	2	628	2	3,0
18.	ii_0158	701	0	777	0	740	3	2,0
19.	ii_0159	375	0	866	2	538	2	3,0
20.	ii_0160	996	0	129	2	583	0	5,0
21.	ii_0162	452	0	369	0	49	4	1,0
22.	ii_0172	65	0	562	3	155	1	4,0
23.	ii_0178	729	0	776	3	324	2	3,0
24.	ii_0179	721	0	662	0	785	4	1,0
25.	ii_0186	825	0	357	1	547	2	3,0
26.	ii_0190	280	0	770	0	920	3	2,0
27.	ii_0194	20	0	961	0	135	2	3,0
28.	ii_0195	520	0	170	0	762	1	4,0
29.	ii_0196	565	0	832	3	724	2	3,0
30.	ii_0199	255	0	291	2	61	2	3,0
31.	ii_0202	817	0	872	0	338	3	2,0
32.	ii_0203	205	0	101	0	770	5	0,0
33.	ii_0204	289	0	494	3	370	1	4,0
34.	ii_0205	87	0	731	2	359	0	5,0
35.	ii_0206	762	0	219	0	17	5	0,0
36.	ii_0215	928	0	99	1	932	2	3,0
37.	ii_0216	353	0	655	3	918	1	4,0

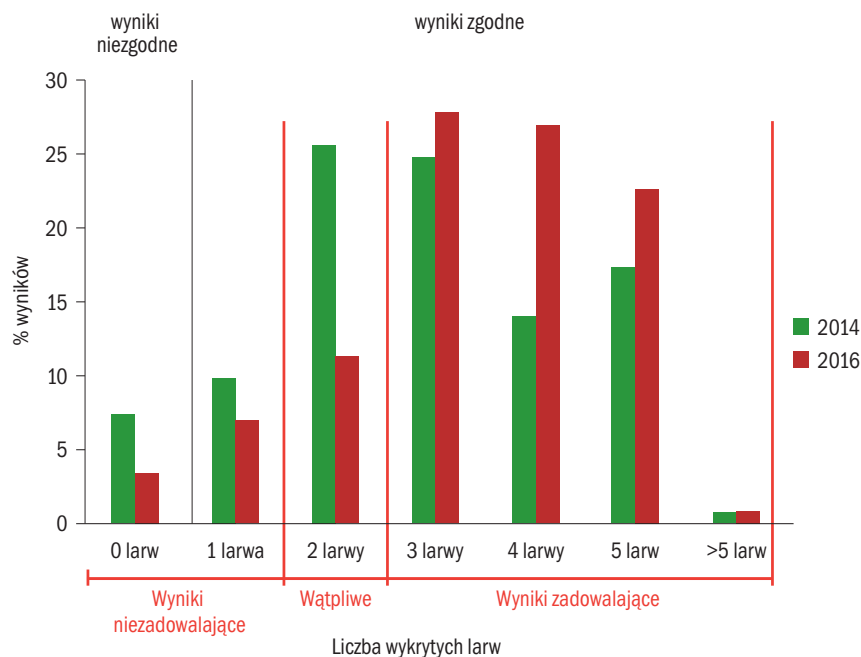
Objaśnienie: |Δ| – wartość bezwzględna



Ryc. 1. Porównanie wyników badania próbek ślepych



Ryc. 2. Porównanie wyników badania próbek mięsa, do których dodano po 3 larwy



uwzględniane w indywidualnej ocenie laboratorium.

Wyniki badań

W badaniu udział wzięło 115 laboratoriów z województwa wielkopolskiego. Dziewięćdziesiąt pięć laboratoriów uzyskało wyniki zgodne, a 20 niezgodne w ocenie jakościowej. Trzy laboratoria uzyskały wynik niezgodny z powodu wykrycia larw w próbkach ślepych, 2 laboratoria uzyskały wyniki niezgodne na wszystkich poziomach domieszki, 1 laboratorium na dwu poziomach, 23 na jednym poziomie, z czego 3 uzyskały wynik wątpliwy na poziomie 5 larw (!). W ocenie ilościowej wyniki niezadawalające uzyskało 12 laboratoriów (10,4%), a 13 (11,3%) wyniki wątpliwe.

Łącznie 37 laboratoriów raportowało wyniki niezgodne, niezadawalające lub wątpliwe. Wyniki te przedstawiono w tabeli 1, kolorem czerwonym zaznaczając wyniki niezgodne i niezadawalające, kolorem żółtym wyniki wątpliwe, kolorem niebieskim wyniki zgodne w ocenie jakościowej i jednocześnie niezadawalające w ocenie ilościowej.

Ocena jakości systemu badań w województwie została przeprowadzona na podstawie wyników analiz próbek na poziomie limitu detekcji metody (1 larwa). W przypadku województwa wielkopolskiego 67% laboratoriów biorących udział w badaniach biegłości wykryło larwę w próbkach kontaminowanych na poziomie limitu detekcji.

Analiza porównawcza ostatnich dwóch tur badań biegłości w woj. wielkopolskim (2014 i 2016 r.)

W 2014 r. w badaniach biegłości w woj. wielkopolskim wzięło udział 121 laboratoriów, a więc o 6 więcej niż w 2016 r. W ocenie jakościowej wyniki zgodne w latach 2014 i 2016 uzyskało odpowiednio 83,5% i 82,6% laboratoriów. Odsetki wyników zgodnych i niezgodnych na poszczególnych poziomach domieszki w latach 2014 i 2016 przedstawiono na rycinach 1, 2 i 3.

Jak wynika z przedstawionych danych, w badaniu próbek niezawierających larw włośni w 2014 r. 98,3% laboratoriów uzyskało wyniki zgodne i w porównaniu z wynikami z 2016 r. były one lepsze o 1%.

Badanie próbek kontaminowanych na poziomie 3 larw wykazało, że w 2016 r. o 4, 7% więcej laboratoriów raportowało

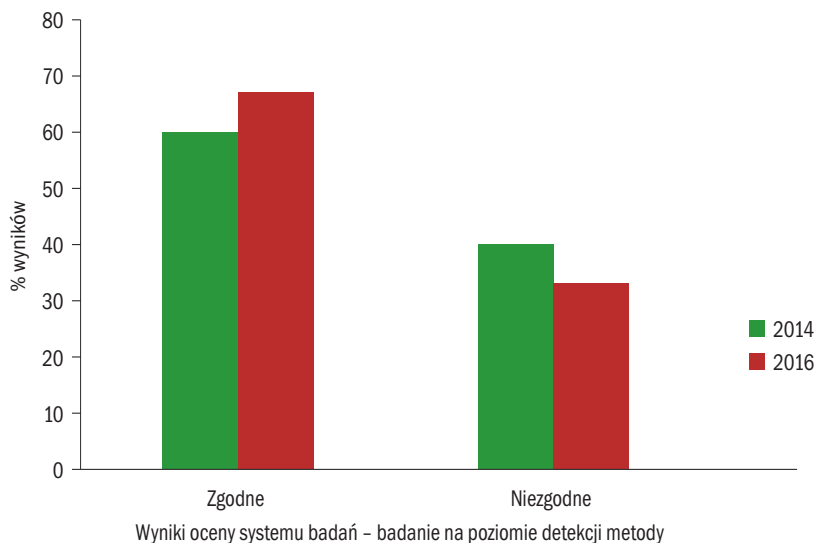
Ryc. 3. Porównanie wyników badania próbek mięsa, do których dodano po 5 larw włośni

wyniki niezgodne, niewykrywając w próbkach larw włośni. Mniejszy o 4, 8% był odsetek laboratoriów raportujących wykrycie 1 larwy, spadł również odsetek laboratoriów raportujących wykrycie 2 larw o 1%. Wzrósł natomiast odsetek wyników zgodnych z wartością referencyjną o prawie 2%, przy jednocześnie spadku odsetka laboratoriów raportujących wyniki wyższe niż wartość referencyjna.

Nieco bardziej skomplikowanie przedstawia się porównanie wyników uzyskanych podczas badania próbek zawierających po 5 larw włośni. W 2016 r. nastąpiła poprawa jakości badania próbek, o 4% mniej próbek zostało zidentyfikowanych jako próbki niezawierające larw, o 3% mniej próbek zostało określonych jako próbki zawierające 1 larwę i o 14% próbek mniej zostało jako zawierających 2 larwy. Jednak można było zaobserwować spadek odsetka wyników raportujących odpowiednio 3 larwy (o 3%), 4 larwy (o 13%) i 5 larw (o 5%). Niezmienny pozostał odsetek laboratoriów raportujących wykrycie więcej niż 5 larw.

Wyniki analizy jakościowej próbek zawierających 5 larw są skorelowane z wynikami analizy ilościowej. W 2014 r. stwierdzono na poziomie kontaminacji 5 larw 9 wyników niezadowolających. Wyniki te wynikały jednak nie z przekroczenia wartości z-score, ale z niestwierdzenia larw włośni w badanych próbkach przez laboratoria. Analizując liczbę wykrywanych larw w próbkach na tym poziomie domieszki i stosując kryteria z 2016 r., odsetek wyników niezadowolających wyniósł jednak 17,3%.

Ocena jakości systemu badań w województwie została przeprowadzona na podstawie wyników analiz próbek na poziomie limitu detekcji metody (1 larwa/próbka). W przypadku województwa wielkopolskiego 67% laboratoriów biorących udział w badaniach biegłości wykryło larwę w próbkach kontaminowanych na poziomie limitu detekcji. Uzyskany wynik (67%) jest niższy niż założenia walidacyjne metody ($\geq 75\%$). Jednocześnie jest on o 7% lepszy od uzyskanego w 2014 r. i świadczy o skutecznej pracy nad systemem badań



Ryc. 4. Porównanie wyników oceny systemu badań w latach 2014 i 2016

w województwie wielkopolskim, co ilustruje **rycina 4**.

Badania biegłości, pomimo trudności w ich realizacji, są narzędziem, dzięki któremu następuje poprawa jakości pracy laboratoriów. Postęp ten jest możliwy dzięki pracy wojewódzkiego koordynatora badań (Zakład Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu) i organizatora badań biegłości Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – PIB w Puławach oraz powiatowych lekarzy weterynarii w obszarze technicznym i edukacyjnym. W trakcie prowadzonych od 2007 r. badań biegłości niezbędne było dostosowanie metodologii badań do zmieniających się celów (metoda ilościowa/metoda jakościowa), sposobów badania (przygotowania próbek do badań – uzyskanie wysokiej jednorodności i stabilności próbek) i liczby uczestników. Organizowane badania biegłości pozwoliły uczestnikom na regularną, obiektywną i niezależną ocenę jakości wykonywanych badań. Analizy wyników badań dostarczają istotnych informacji dla koordynatorów, jak i organów kontrolnych. Obserwacja wyników badań biegłości w kolejnych latach w województwie wielkopolskim wskazuje na stopniową poprawę jakości prowadzonych badań, co jest szczególnie ważne w województwie, w którym włośnica występuje endemicznie.

Piśmiennictwo

1. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 882/2004/WE
2. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (WE) 1375/2015
3. Ustawa z 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej
4. PN-EN ISO/IEC 17043:2011
5. ISO/IEC 17025:2005
6. www.piwet.pulawy.pl/pt/wlosnie_2016htm
7. Sprawozdanie nr PIWet-PT/2014/ZP/Trichin/01/ z badań biegłości w zakresie: międzylaboratoryjnych badań biegłości laboratoriów badających mięso na obecność włośni metodą wytrawiania wspomaganego mieszadłem magnetycznym. Województwo wielkopolskie