



**GLÓWNY INSPEKTOR  
OCHRONY ROŚLIN I  
NASIENICTWA**  
*Tadeusz Kłos*

Warszawa, 04.07.2013 r.

CL- 091-3a/2013

Pan  
Adam Błochowiak  
Wojewódzki Inspektor  
Ochrony Roślin i Nasiennictwa  
w Poznaniu

**Wystąpienie pokontrolne**

po kontroli Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa w Poznaniu przeprowadzonej w dniach 13 – 14 maja 2013 r. przez Witolda Karnkowskiego - głównego specjalistę w Centralnym Laboratorium Głównego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa.

.....Skontrolowano Laboratorium Wojewódzkie w Poznaniu oraz dwa losowo wybrane Oddziały w Gnieźnie i Wrześni w zakresie:

- pobierania próbek gleby w ramach urzędowych kontroli występowania mątwików tworzących cysty na ziemniaku, wliczając w to:
  - termin próbkobrania,
  - sposób pobierania próbek i ich objętość,
  - sprzęt do pobierania próbek,
  - sposób pakowania i etykietowania próbek oraz warunki ich przechowywania przed badaniem,
- wykonywania badań laboratoryjnych próbek gleby na obecność mątwików tworzących cysty na ziemniaku, w tym:
  - warunki lokalowe i techniczne, organizacja i przebieg badań w zakresie ekstrakcji cyst z próbek i identyfikacji nicieni metodą morfologiczno-metryczną oraz z zastosowaniem metod molekularnych,
  - kompetencje pracowników i ich udokumentowanie,
  - terminowość przeprowadzania badań i wystawiania wyników,
  - zapisy z badań,
  - postępowanie z odpadami pozostałymi po badaniach.

Kontrolą objęto okres od dnia 13 maja 2012 r. do dnia kontroli

## Ustalenia kontroli i ocena skontrolowanej działalności.

### 1) Oddział w Gnieźnie

#### Ustalenia

- **Personel, warunki lokalowe i techniczne**

Oddział mieści się w budynku wolno stojącym przy ul. Kiszkowskiej 7, należącym do Spółdzielni Kółek Rolniczych (SKR) w Gnieźnie, gdzie znajdują się też inne instytucje o różnym profilu działalności. Oddział posiada do dyspozycji trzy pomieszczenia o łącznej powierzchni 41,75 m<sup>2</sup>, w tym dwa pomieszczenia biurowe i jedno laboratoryjne. Wszystkie pomieszczenia znajdują się na jednej kondygnacji (1 piętro).

Pomieszczenia Oddziału są zabezpieczone przed dostępem osób nieupoważnionych za pomocą drzwi zewnętrznych antywłamaniowych prowadzących na klatkę schodową oraz drzwi prowadzących do poszczególnych pomieszczeń, które są zamykane na klucz podczas nieobecności pracowników. Po godzinach pracy jest włączany alarm, a na terenie posesji obecna jest osoba stróżująca.

Oddział zatrudnia 5 pracowników, spośród których uprawnienia państwowego inspektora posiadają 3 osoby.

Oddział dysponuje sprzętem do pobierania próbek gleby oraz podstawowymi aktami prawnymi i dokumentami metodycznymi określającymi sposób przeprowadzania urzędowych kontroli mątwików tworzących cysty na ziemniaku i pobierania próbek materiału roślinnego, gleby i podłoża z przeznaczeniem do badań fitosanitarnych oraz literaturą fachową, stosownie do zakresu wykonywanych kontroli.

- **Organizacja urzędowych kontroli występowania *Globodera* spp.**

Oddział przeprowadza urzędowe kontrole występowania *Globodera* spp. na terenie powiatu gnieźnieńskiego. Próbkę gleby przeznaczoną do badań na obecność tych nicieni pobierane są przy pomocy lasek glebowych o długości kanału wynoszącej ok. 30 cm i średnicy ok. 20 mm, które służą jednocześnie do pobierania próbek gleby przeznaczonej do analiz na obecność *Synchytrium endobioticum* oraz nicieni z rodzajów *Longidorus* i *Xiphinema*. Przeprowadzenie próbkobrania we właściwy sposób jest jednak utrudnione, gdyż na sondzie laski nie jest zaznaczona głębokość 10 cm, z której należy pobierać glebę do badań na obecność cyst mątwików, ani nie zagwarantowano w inny sposób pobierania gleby z tej głębokości. Gleba pobrana podczas próbkobrania jest umieszczana w wiadrze plastikowym. Następnie pobrany materiał zostaje dokładnie wymieszany i przywieziony do Oddziału. Tutaj w miarę potrzeby gleba jest przesuszana i przesiewana na sicie o średnicy oczek 2,5 mm, a wydzielone z niej poszczególne próbki o objętości 200 ml są pakowane indywidualnie do woreczków foliowych, zszywanych i zaopatrzonych w dwie etykiety – jedną umieszczoną wewnątrz, a drugą na części zewnętrznej woreczka.

Próbki są rejestrowane w pomieszczeniu biurowym, a następnie przygotowywane do badań (przesuszanie, przesiewanie, pakowanie) w pomieszczeniu laboratoryjnym. Wszystkie próbki są przekazywane do badań w Laboratorium Wojewódzkim w Poznaniu, które po zakończeniu analiz przesyła do Oddziału „Sprawozdanie z badań”. Podmiot zlecający analizę otrzymuje w każdym przypadku „Informację o wyniku badania laboratoryjnego”, przygotowaną zgodnie z wzorem opracowanym przez WIORiN Poznań. Kopia tego dokumentu jest przechowywana w Oddziale. Jeśli nie jest możliwe przekazanie próbek do badań w Laboratorium Wojewódzkim bezpośrednio po ich pobraniu, przechowywane są one

w pomieszczeniu laboratoryjnym, na stole laboratoryjnym. Brak oznakowania miejsca ich przechowywania.

Sprawdzono dokumentację dotyczącą pobierania:

- próbek gleby z pól przeznaczonych pod uprawę elitarnych i kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka: próbki pobrane wg protokołów gnie/65/12 i gnie/9/13;
- próbek gleby z pól przeznaczonych pod założenie szkółek roślin, dla których istnieje obowiązek zaopatrzenia w paszport roślin: gnie/28/12 (próbki z pól pod założenie matecznika truskawek) i gnie/5/13 (próbki z pola pod założenie szkółki drzew owocowych);
- próbek gleby z pól, na których uprawiane są ziemniaki inne niż sadzeniaki: próbki pobrane wg protokołów gnie/67/12 i gnie/77/13.

W roku 2012 całą dokumentację dotyczącą próbek gleby pobranych w ramach badań na obecność *Globodera* spp. przechowywano w segregatorze OGN.7124.10 „Lustracje roślin, produktów roślinnych i przedmiotów”.

W 2013 r sposób gromadzenia dokumentacji uległ zmianie i dokumenty są przechowywane w segregatorach:

- dokumenty dotyczące kontroli pól pod uprawy sadzeniaków – segregator OGN.7124.2. „Lustracje, kontrole roślin, produktów roślinnych i przedmiotów”;
- kontrole upraw ziemniaków jadalnych – w bieżącym roku nie było kontroli i nie podjęto decyzji, w jakim segregatorze należy gromadzić dokumentację;
- kontrole gruntów pod założenie szkółek roślin ozdobnych i sadowniczych wymagających obowiązkowi paszportowania – segregator OGN.7124.13 „Wnioski o wydanie paszportów i dokumentacja towarzysząca”.

W 2012 roku pracownicy Oddziału pobrali do badań, w ramach urzędowych kontroli występowania matkwików tworzących cysty na ziemniaku łącznie 934 próbki gleby, w tym:

- pola pod uprawę elitarnych i kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka – 310 próbek;
- uprawy ziemniaka jadalnego – 46 próbek;
- pola przeznaczone pod założenie szkółek roślin podlegających obowiązkowi paszportowania – 578 próbek.

W 2013 r., do dnia kontroli pobrano do badań na obecność *Globodera* spp. 29 próbek gleby, z tego z pól przeznaczonych pod uprawę elitarnych i kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka 23 próbki, a z pól przeznaczonych pod założenie szkółek roślin podlegających obowiązkowi paszportowania 6 próbek.

Wyniki badań wszystkich próbek pobranych w latach 2012 – 2013 były negatywne.

#### Ocena:

Nie stwierdzono uchybień odnośnie terminu próbkobrania i objętości pobranej gleby w ramach urzędowych kontroli występowania *Globodera* spp. oraz sposobu pakowania pobranych próbek. Na sondzie lasek glebowych używanych podczas próbkobrania brak jest zaznaczenia punktu, oznaczającego głębokość (10 cm), z jakiej należy pobierać próbkę gleby do badań pod kątem obecności *Globodera* spp., a ich kanały nie posiadają blokady na tej wysokości, co może skutkować pobraniem próbki z niewłaściwej głębokości.

Przed wysyłką do Laboratorium Wojewódzkiego w Poznaniu próbki są przechowywane we właściwych warunkach, lecz miejsce ich składowania nie jest odpowiednio oznakowane. Dokumentacja odnośnie pobierania próbek jest prowadzona i przechowywana we właściwy sposób.

## 2) Oddział we Wrześni

### Ustalenia

- **Personel, warunki lokalowe i techniczne**

Oddział w mieści się w budynku wolno stojącym przy ul. Gen. Sikorskiego 34, gdzie znajduje się też Oddział Agencji Modernizacji i Restrukturyzacji Rolnictwa (ARMiR), a właścicielem jest Spółdzielnia Kółek Rolniczych (SKR) we Wrześni. Oddział posiada do dyspozycji trzy pomieszczenia o łącznej powierzchni 66 m<sup>2</sup>, w tym dwa pomieszczenia biurowe i jedno laboratoryjne. Wszystkie pomieszczenia znajdują się na jednej kondygnacji (pierwsze piętro).

Pomieszczenia Oddziału są zabezpieczone przed dostępem osób nieupoważnionych za pomocą drzwi zewnętrznych oraz drzwi prowadzących do poszczególnych pomieszczeń, zaopatrzonych w zamek patentowy, zamykany podczas nieobecności pracowników.

Oddział we Wrześni zatrudnia 4 pracowników posiadających uprawnienia państwowego inspektora.

Oddział dysponuje sprzętem do pobierania próbek gleby oraz podstawowymi aktami prawnymi i dokumentami metodycznymi określającymi sposób przeprowadzania urzędowych kontroli wątków tworzących cysty na ziemniaku i pobierania próbek materiału roślinnego, gleby i podłoża z przeznaczeniem do badań fitosanitarnych oraz literaturą fachową, stosownie do zakresu wykonywanych kontroli.

- **Organizacja urzędowych kontroli występowania *Globodera* spp.**

Oddział przeprowadza urzędowe kontrole występowania *Globodera* spp. na terenie powiatu wrześnieńskiego. Podobnie jak w przypadku Oddziału w Gnieźnie próbki gleby przeznaczone do badań na obecność tych nicieni pobierane są przy pomocy lasek glebowych, których kanał ma długość ok. 30 cm i średnicę ok. 20 mm, które służą jednocześnie do pobierania próbek gleby przeznaczonej do analiz na obecność *Synchytrium endobioticum* oraz nicieni z rodzajów *Longidorus* i *Xiphinema*. Przeprowadzenie próbkobrania we właściwy sposób jest jednak utrudnione, gdyż na sondzie lasek nie jest zaznaczona głębokość 10 cm, z której należy pobierać glebę do badań na obecność cyst wątków, ani nie zagwarantowano w inny sposób pobierania gleby z tej głębokości. Gleba pobrana podczas próbkobrania jest umieszczana w wiadrze metalowym. Następnie pobrany materiał zostaje dokładnie wymieszany, na polu wydzielone są z niego próbki o objętości 200 ml, które są pakowane do woreczków, zszywane i zaopatrywane w jedną etykietę u posiadacza gruntu. Próbki są następnie przewożone do Oddziału, rejestrowane w jego pomieszczeniu biurowym i przekazywane do badań w Laboratorium Wojewódzkim w Poznaniu, które po zakończeniu analiz przesyła do Oddziału „Sprawozdanie z badań”. Podmiot zlecający analizę otrzymuje w każdym przypadku „Informację o wyniku badania laboratoryjnego”, lecz w dokumentacji Oddziału brak kopii tego dokumentu. Jeśli nie jest możliwe przekazanie próbek do badań w Laboratorium Wojewódzkim bezpośrednio po ich pobraniu, przechowywane są one w pomieszczeniu laboratoryjnym w wydzielonej i odpowiednio oznakowanej szafce.

Sprawdzono dokumentację dotyczącą pobierania:

- próbek gleby z pól przeznaczonych pod uprawę elitarnych i kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka i zakładanie kopców: próbki pobrane wg protokołu wrze/7/13;
- próbek gleby z pól przeznaczonych pod założenie szkółek roślin, dla których istnieje obowiązek zaopatrzenia w paszport roślin: próbki pobrane wg protokołu wrze/44/12;
- próbek gleby z pól, na których uprawiane są ziemniaki inne niż sadzeniaki: próbki pobrane wg protokołów: wrze/7/12 i wrze/15/12;
- próbek podłoży torfowych przeznaczonych pod nasadzenia roślin: próbki pobrane wg protokołu wrze/6/12;
- próbek podłoży towarzyszących roślinom przeznaczonym na eksport: próbka pobrana wg protokołu wrze/28/12.

W 2012 roku całość dokumentacji dotycząca próbek gleby pobranych w ramach badań na obecność *Globodera* spp. przechowywana była w segregatorach:

- OWR.7124.10 „Lustracje, kontrole podmiotów podlegających rejestracji i prowadzących obrót ziemniakiem” (dokumentacja kontroli na polach przeznaczonych pod uprawę sadzeniaków, szkółek roślin podlegających obowiązkowi paszportowania – [torf pod nowe nasadzenia roślin, gleba pod szkólkę leśną] oraz kontroli upraw ziemniaków innych niż sadzeniaki);
- OWR.7121.2 „Lustracje roślin, produktów roślinnych i przedmiotów” (próbki torfu od dystrybutora podłoża);
- dokumentacja prób torfu przeznaczonego na eksport (próbki torfu od dystrybutora podłoża) – segregator OWR.7124.3 ”Obsługa fitosanitarna eksportu/reeksportu i dokumentacja towarzysząca świadectwom fitosanitarnym”.

W 2013 r. sposób gromadzenia dokumentacji nie uległ zmianie i dokumenty dotyczące kontroli występowania *Globodera* spp. są przechowywane w segregatorach zgodnie z numerami przewodnimi spraw, których dotyczą:

- dokumentacja kontroli na polach przeznaczonych pod uprawę sadzeniaków oraz założenie szkółek roślin podlegających obowiązkowi paszportowania – segregator OWR.7124.10. „Lustracje, kontrole podmiotów podlegających rejestracji.”;
- dokumentacja kontroli upraw ziemniaków jadalnych – w bieżącym roku nie było kontroli; dokumentacja będzie przechowywana w segregatorze OWR.7124.10. „Lustracje, kontrole podmiotów podlegających rejestracji”;
- dokumentacja odnosząca się do prób torfu przeznaczonego na eksport (próbki torfu od dystrybutora podłoża) – segregator OWR.7124.3 ”Obsługa fitosanitarna eksportu/reeksportu i dokumentacja towarzysząca świadectwom fitosanitarnym” .

W 2012 roku pracownicy Oddziału pobrali do badań, w ramach urzędowych kontroli występowania mątwików tworzących cysty na ziemniaku, pobrali łącznie 63 próbki gleby, w tym:

- uprawy ziemniaka jadalnego i przemysłowego – 51 próbek;
- pola przeznaczone pod założenie szkółek roślin podlegających obowiązkowi paszportowania 4 próbki;
- torf przeznaczony do nasadzeń szkółkarskich – 1 próbka;
- torf przeznaczony na eksport – 1 próbka;
- torf towarzyszący roślinom przeznaczonym na eksport – 6 próbek.

W 2013 roku, do dnia kontroli, pobrano 34 próbki gleby do badań na obecność *Globodera* spp., z tego z pól przeznaczonych pod uprawę elitarnych i kwalifikowanych sadzeniaków ziemniaka – 30 próbek, 2 próbki z gruntów przeznaczonych pod założenie kopców i 2 próbki torfu (jedna pobrana z partii przeznaczonej na eksport, a druga z partii do obrotu krajowego).

Wyniki badań wszystkich próbek pobranych w latach 2012-2013 były negatywne.

### Ocena

Nie stwierdzono uchybień odnośnie terminu próbkobrania i objętości pobranej gleby w ramach urzędowych kontroli występowania *Globodera* spp. oraz sposobu pakowania pobranych próbek. Na sondzie lasek glebowych używanych podczas próbkobrania brak jest zaznaczenia punktu, oznaczającego głębokość (10 cm), z jakiej należy pobierać próbkę gleby do badań pod kątem obecności *Globodera* spp., a ich kanały nie posiadają blokady na tej wysokości, co może skutkować pobraniem próbki z niewłaściwej głębokości. Przed wysyłką do laboratorium Wojewódzkiego w Poznaniu próbki są przechowywane we właściwych warunkach. Dokumentacja odnośnie pobierania próbek jest prowadzona i przechowywana w sposób właściwy, za wyjątkiem braku na Protokołach Pobrania Prób nr wrze/7/12 i wrze/15/12 jednoznacznej informacji, że dotyczą one pobierania próbek gleby pól, na których uprawiane są ziemniaki inne niż sadzeniaki (podano tylko „gleba – uprawa ziemniaków”; Załącznik 1) oraz nieumieszczenia w dokumentacji Oddziału kopii dokumentów „Informacja o wyniku badania laboratoryjnego” przesłanego do podmiotu zgłaszającego konieczność przeprowadzenia urzędowej kontroli.

### **3) Laboratorium Wojewódzkie w Poznaniu**

#### Ustalenia

- **Organizacja laboratorium**

Laboratorium mieści się w budynku wolno stojącym przy ulicy Grunwaldzkiej 250 B, gdzie znajduje się siedziba Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa w Poznaniu oraz Oddziału WIORiN w Poznaniu. Ogólna powierzchnia Laboratorium wynosi 1209,4 m<sup>2</sup>, w tym działalność laboratoryjna prowadzona jest w 24 pomieszczeniach. Ponadto, laboratorium dysponuje 5 pomieszczeniami biurowymi i 3 pomieszczeniami szklarniowymi. Pomieszczenia laboratorium są zabezpieczone przed dostępem osób nieupoważnionych za pomocą drzwi z zamkiem szyfrowym, a ponadto po godzinach pracy na terenie obiektu obecny jest portier oraz prowadzony jest monitoring otoczenia obiektu z użyciem kamer.

Pracownie diagnostyczne zlokalizowane są na trzech kondygnacjach. Na parterze mieści się pomieszczenie rejestracji i przyjmowania prób, pracownia nematologii i entomologii, pomieszczenia przygotowania próbek pracowni mikologii, magazyn odczynników i materiałów laboratoryjnych oraz magazyn przechowywania próbek po badaniu. Na pierwszym piętrze mieszczą się pracownie: pracownia ogólna, pracownie wirusologii, bakteriologii, mikologii i pracownia PCR. W piwnicy znajdują się dwa magazyny ziemniaków i dwa pomieszczenia do przygotowania próbek ziemniaka do badań bakteriologicznych i wirusologicznych.

Laboratorium posiada sprzęt niezbędny do ekstrakcji cyst mątwików (2 automatyczne ekstraktory cyst) oraz identyfikacji cyst *Globodera* spp. metodą mikroskopową (morfologiczno-metryczną) i z zastosowaniem testów molekularnych.

Konserwacja mikroskopu w pracowni nematologii i entomologii jest prowadzona na bieżąco (ostatnia miała miejsce 07.11.2012 r.) przez pracownika firmy Zeiss i udokumentowana stosownym certyfikatem. Właściwości pomiarowe powyższego mikroskopu były po raz ostatni sprawdzane dnia 09.11.2012 r., a wynik sprawdzania został udokumentowany w formularzu „Oznaczenie wartości działki mikrometru okularowego w mikroskopie biologicznym „Axiolab re” o numerze laboratoryjnym POM/06/17/8 za pomocą wzorca kreskowego o numerze laboratoryjnym POM/W/116/22.

Automatyczny ekstraktor cyst jest raz na rok poddawany konserwacji połączonej z wymianą oleju w pompie przemywającej, a po konserwacji wydawane jest stosowne świadectwo. Ostatnia konserwacja obu aparatów miała miejsce dnia 21.09.2012.

Sita zbiorcze automatycznego ekstraktora cyst (laboratorium dysponuje 3 sitami) są poddawane sprawdzaniu zewnętrznemu potwierdzonemu certyfikatem, a następnie sprawdzaniu wewnętrznemu (wizualny przegląd siatki sita), co jest udokumentowane w „Karcie przeglądu siatki sita”.

Kluczowy sprzęt do identyfikacji nicieni z zastosowaniem testów molekularnych (waga, pipety, chłodziarko-zamrażarka, wirówki, amplifikator, termoblok, itp.) jest poddawany regularnemu sprawdzaniu przez specjalistyczne firmy, udokumentowanemu certyfikatem.

Laboratorium posiada odczynniki chemiczne stosownie do zakresu analiz. Są one skatalogowane, a ewidencja ich użycia prowadzona jest na „Karcie zużycia odczynników chemicznych”. Laboratorium posiada odpowiednie materiały odniesienia stosowane w identyfikacji cyst mątwików z rodzaju *Globodera* do gatunku metodą morfologiczno-metryczną (preparaty mikroskopowe stożków wulwalnych cyst i osobników młodocianych potwierdzone przez GIORiN CL) i z zastosowaniem metody multiplex-PCR (DNA nicieni). Oba rodzaje materiałów odniesienia są odpowiednio oznakowane i skatalogowane.

Laboratorium dysponuje podstawowymi aktami prawnymi i dokumentami metodycznymi oraz literaturą fachową na temat postępowania podczas badania próbek gleby na obecność mątwików tworzących cysty na ziemniaku i identyfikacji nicieni do gatunku metodą morfologiczno-metryczną oraz z zastosowaniem testów molekularnych.

W laboratorium zatrudnionych jest 17 osób, w tym 13 pracowników merytorycznych i 4 pracowników obsługi technicznej. W przypadku pracowników na stanowiskach merytorycznych określono specjalizację w zakresie diagnostyki poszczególnych grup organizmów szkodliwych, z uwzględnieniem zastępstwa. Pracownicy merytoryczni zostali przeszkoleni w na temat identyfikacji cyst mątwików z rodzaju *Globodera* do gatunku metodą morfologiczno-metryczną oraz z zastosowaniem metod molekularnych, a pracownicy obsługi technicznej przeszli szkolenia wewnętrzne z zakresu przygotowania próbek gleby do badań nematologicznych oraz ekstrakcji z nich cyst mątwików. Kompetencje pracowników są udokumentowane w karcie ZL-02.00/3 „Weryfikacja umiejętności pracownika”.

- **Realizacja badań próbek gleby na obecność *Globodera* spp.**

Laboratorium Wojewódzkie przeprowadza badania, na obecność mątwików tworzących cysty na ziemniaku, próbek gleby pochodzących z terenu 21 powiatów województwa wielkopolskiego. Ponadto Delegatura w Kaliszu prowadzi we własnym zakresie analizę próbek gleby pochodzących z powiatów: kaliskiego, ostrzeszowskiego, ostrowskiego, kępickiego, krotoszyńskiego i pleszewskiego, a Delegatura w Koninie z terenu powiatów: konińskiego, słupeckiego, kolskiego i tureckiego. Analizy prowadzone przez te Delegatury obejmują ekstrakcję cyst i ich identyfikację do gatunku metodą morfologiczno-metryczną. W przypadku wątpliwości w zakresie identyfikacji nicieni, cysty kierowane są do Laboratorium Wojewódzkiego celem dalszych analiz.

W okresie objętym kontrolą ekstrakcję i identyfikację wąteków tworzących cysty na ziemiaku prowadzono zgodnie z procedurą „Wykrywanie cyst *Globodera* spp. w podłożu z wykorzystaniem automatycznego ekstraktora cyst oraz ich oznaczanie do gatunku”, wydanie 5 z dnia 06.06.2011 r.

Próbki gleby przekazywane do badań są rejestrowane w pomieszczeniu rejestracji próbek. Numery nadane poszczególnym próbkom są zapisywane wodoodpornym pisakiem na woreczku (opakowanie próbki) i etykietach.

Próbki przygotowane do badania są umieszczane w zamkniętym pojemniku i przenoszone do pracowni nematologii i entomologii, gdzie są poddawane analizie z zastosowaniem automatycznego ekstraktora cyst przez pracownika technicznego lub merytorycznego. Materiał wyekstrahowany z próbki zbierany jest na okrągłym sicie o średnicy oczek 0,2 mm. Następnie zawartość tego sita analizowana jest na sączku z bibuły pod kątem obecności cyst wąteków przez pracownika merytorycznego (uprawnienia do badań posiadają 3 osoby).

Identyfikację cyst metodą morfologiczno-metryczną przeprowadza dwoje pracowników merytorycznych. Cysty wąteków stwierdzone podczas badań są wyławiane przy pomocy pęsety i przenoszone do kropli wody umieszczonej na szkiełku zegarkowym, gdzie są one przecinane w celu określenia, czy zawierają żywe jaja i osobniki młodociane. Następnie przygotowuje się preparaty mikroskopowe stożków wulwalnych cyst i znajdujących się w cystach osobników młodocianych. Ekstrakcja cyst i przeglądanie sączków jest dokumentowane w „Karcie ekstrakcji cyst z próbek gleby”, PB/N-01.00/1, a identyfikacja cyst w „Karcie oznaczania cyst wąteków z rodzaju *Globodera*”, PB/N-01.00/2. Wypełnione karty przechowywane są w pracowni nematologii i entomologii. Aparatura używana podczas badania próbek i data jej wykorzystania jest odnotowana w „Karcie badań dla metody badawczej”, RB-06.00/2. Dokumentację wyniku stanowią też preparaty mikroskopowe, które są zaopatrzone w etykiety i przechowywane w pracowni nematologii i entomologii.

Identyfikacja cyst z zastosowaniem testu multiplex-PCR prowadzona jest w przypadku cyst wyizolowanych z 20% próbek pozytywnych oraz wtedy, gdy wynik identyfikacji metodą morfologiczno-metryczną nie jest jednoznaczny.

Materiał przeznaczony do testów molekularnych (osobniki młodociane wyizolowane z cyst umieszczone w próbówce Eppendorfa z wodą ultraczystą do testów molekularnych) przygotowujący jest przez osobę wykonującą identyfikację nicieni metodą morfologiczno-metryczną.

Identyfikacja nicieni z zastosowaniem testów molekularnych przeprowadzana jest w pracowni PCR (uprawnienia posiada 2 pracowników), zgodnie z procedurą PB/P-01.00 "Identyfikacja nicieni *Globodera rostochiensis* i *Globodera pallida* metodą testu multiplex-PCR" (obecnie obowiązuje wydanie 2 z dnia 17.09.2012 r.).

Zważywszy na ograniczone warunki lokalowe, pracownia analiz PCR obejmuje tylko dwa pomieszczenia. W pierwszym odbywa się ekstrakcja DNA, przygotowanie mixu, nakładanie matryc i amplifikacja DNA, natomiast w drugim elektroforeza i wizualizacja produktów reakcji PCR. Przygotowywanie żelu do elektroforezy (odważenie agarozy i podgrzanie żelu w kuchence mikrofalowej) odbywa się w oddzielnym pomieszczeniu wagowym. Aby zapobiec kontaminacji próbek, podczas badania stosowana jest izolacja czasowa (izolacja DNA pierwszego dnia, przygotowanie mixu i PCR następnego dnia). Sterylizacja pomieszczeń odbywa się za pomocą lamp UV, które są włączane przed rozpoczęciem pracy i po każdym etapie badania. Zgodnie z informacją przekazaną przez pracowników laboratorium, czas pracy lamp jednorazowo wynosi ok. 15 minut, jednak nie jest on nigdzie odnotowany. W trakcie analiz stosowane są kontrole pozytywne i negatywne PCR oraz kontrola negatywna elektroforezy.



Aparatura używana podczas badania próbek jest odnotowana w „Karcie badań dla metody badawczej”, RB-06.00/2. Wyniki testów są dokumentowane w „Karcie oznaczania nicieni *Globodera rostochiensis* i *Globodera pallida* dla testu metodą multiplex-PCR”, PB/P-01.00/1 i kolorową fotografią układu prążków na żelu. Ponadto zachowywane jest DNA wyizolowane z nicieni.

Odpady pozostałe po przygotowaniu próbek gleby i ich ekstrakcji oraz identyfikacji metodą morfologiczno-metryczną, wliczając w to opakowania próbek i pozostałości po próbkach, są gromadzone w worku umieszczonym w pojemniku i następnie zostają poddane sterylizacji w autoklawie, a następnie traktowane jako odpady komunalne. Odpady po analizach molekularnych są gromadzone w odpowiednich pojemnikach przeznaczonych do spalania.

Dokonano sprawdzenia terminowości przeprowadzenia analiz oraz dokumentacji towarzyszącej próbkom pobranym przez Oddziały w Gnieźnie i Wrześni, których dokumentacja odnośnie próbkobrania została sprawdzona podczas kontroli w tych Oddziałach. Były to próbki pobrane wg protokołów: gnie/28/12 (próbki 2837-3036/12), gnie/65/12 (próbki 7109-7185/12), gnie/76/12 (próbki 9110-9114/12), gnie77/13 (próbki 9115-9127/12), gnie/5/13 (próbki 396-397/13), gnie/9/13 (próbki 906-918/13), wrze/6/12 (próbka 1479/12), wrze/7/12 (próbki 1481-1482/12), wrze/15/12 (próbki 2603-2604/12), wrze 28/12 (próbki 5407-5411/12), wrze/44/12 (próbki 7857-7858/12) i wrze/7/13 (próbki 1718-1761/13).

Zważywszy na fakt, że wyniki analiz próbek pobranych wg wszystkich ww. protokołów były negatywne, dodatkowo poddano analizie dokumentację towarzyszącą próbkom pobranym przez inne Oddziały, w których stwierdzono obecność mątwika ziemniaczanego (*Globodera rostochiensis*). Były to próbki pobrane wg protokołów:

- ostr4/10/13 (próbki 1971-1972/12 oraz 1976/12) - identyfikacja cyst prowadzono tylko metodą morfologiczno-metryczną;
- kępn/87/12 (próbki 8758-61/12) - identyfikacja metodą morfologiczno-metryczną i z zastosowaniem testów molekularnych.

Po zakończeniu badania Oddział zlecający badania otrzymuje „Sprawozdanie z badań”.

Protokoły pobrania prób i sprawozdania z badań przechowywane są w segregatorach „Sprawozdania z badań i protokoły pobrania prób” gromadzonych w jednym z pomieszczeń biurowych laboratorium. Pełna dokumentacja badań prowadzona jest w Zintegrowanym Systemie Informatycznym w Ochronie Roślin i Nasiennictwie (ZSI).

W 2012 r. Laboratorium Wojewódzkie w Poznaniu poddało analizom na obecność mątwików tworzących cysty na ziemniaku 3180 próbek gleby. Identyfikację cyst metodą morfologiczno-metryczną przeprowadzono w przypadku 25 próbek, a analizy z zastosowaniem testu multiplex-PCR w przypadku 9 próbek, stwierdzając we wszystkich przypadkach obecność mątwika ziemniaczanego (*Globodera rostochiensis*). W 2013 r., do dnia kontroli, analizie na obecność cyst mątwików poddano 1192 próbki gleby, przeprowadzając identyfikację metodą morfologiczno-metryczną cyst stwierdzonych w 3 próbkach (stwierdzono *G. rostochiensis*), lecz nie prowadzono identyfikacji nicieni z zastosowaniem testów molekularnych.

## Realizacja zaleceń pokontrolnych odnoszących się poprzedniej kontroli problemowej

Sprawdzono również realizację zaleceń pokontrolnych z kontroli problemowej przeprowadzonej w dniu 29 października 2008 r., (dotyczącej oceny poprawności wdrożenia metody FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*, do badań bulw ziemniaka na obecność bakteriozy pierścieniowej ziemniaka). Zalecenia odnosiły się do metody immunofluorescencji (IF), która stanowi integralną część procedury wykrywania i identyfikacji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*). Działania podjęte w ramach realizacji zaleceń:

- Wykonywanie preparatów kontroli pozytywnej z użyciem zawiesiny bakterii o właściwej koncentracji komórek, tak by możliwe było ustalenie wartości miana zastosowanych przeciwciał.

Podjęto następujące działania w celu ustosunkowania się do zalecenia:

Przygotowywane są preparaty kontroli pozytywnej z użyciem zawiesiny bakterii  $10^6$  komórek/ml z 48-godzinnej kultury roboczej *Cms* oraz jej rozcieńczenia w stosunku 1|:100. Takie rozcieńczenie zawiesiny pozwala na precyzyjne ustalenie i sprawdzenie wartości miana zastosowanych przeciwciał.

- Każdorazowe określanie i zaznaczanie w karcie testu IF miana zastosowanych przeciwciał, co jest niezbędne do prawidłowej interpretacji wyników oceny mikroskopowej preparatów z badanych próbek,

Podjęto następujące działania w celu ustosunkowania się do zalecenia:

Miano jest ustalane po otwarciu nowej partii surowicy oraz każdorazowo dla danej partii preparatów, co jest zaznaczanie w kartach testu IF.

- Umieszczanie w kartach testu IF informacji o numerze kontroli pozytywnej.

Podjęto następujące działania w celu ustosunkowania się do zalecenia:

Umieszczanie na kartach testu IF numeru kontroli pozytywnej:

- dla *Cms* jest to numer kultury roboczej pochodzącej ze szczepu referencyjnego;
- dla *Ralstonia solanacearum* jest to nadany w laboratorium numer zawiesiny liofilizatu bakterii.

## Ocena

Warunki lokalowe w pomieszczeniach, gdzie dokonuje się rejestracji próbek gleby, przeprowadza ekstrakcję cyst oraz ich identyfikację metodą morfologiczno-metryczną są właściwe.

Zważywszy, że do identyfikacji cyst z zastosowaniem testu multiplex-PCR są wykorzystywane dwa pomieszczenia, stosowana jest izolacja czasowa. Postępowanie to sprawdza się w przypadku badania małej liczby próbek (zgodnie z informacją przekazaną przez personel Laboratorium dotychczas nie odnotowano przypadków kontaminacji próbek), jednak ze względu na ryzyko kontaminacji obecny system byłby niemożliwy do stosowania w

przypadku zwiększenia liczby próbek. Punkt krytyczny stanowi stanowisko przygotowania mixu do PCR sąsiadujące ze stanowiskiem do izolacji DNA (Załącznik 2), gdzie jest możliwa kontaminacja DNA, który może występować w powietrzu w formie aerozolu. W przyszłości, w przypadku znaczącego wzrostu liczby próbek poddawanych badaniom, przy braku możliwości zapewnienia izolacji czasowej, wskazane byłoby wyposażenie pracowni w komorę z laminarnym przepływem powietrza lub wydzielenie osobnego pomieszczenia do przygotowywania mixu do PCR.

Lampy przeznaczone do sterylizacji powyższego pomieszczenia światłem UV są odpowiednie w odniesieniu do jego powierzchni, lecz czas sterylizacji wynoszący 15 minut może nie być wystarczający do zapewnienia odpowiedniej sterylności powietrza podczas badań. Jakkolwiek, jak już wcześniej wspomniano, dotychczas nie odnotowano przypadków kontaminacji próbek. Wyposażenie Laboratorium w sprzęt niezbędny do ekstrakcji cyst mątwików oraz ich identyfikacji metodą mikroskopową (morfologiczno-metryczną) i z zastosowaniem testów molekularnych jest właściwe, a stan techniczny urządzeń nie budzi zastrzeżeń.

Odczynniki chemiczne są zakodowane i skatalogowane oraz przechowywane we właściwych warunkach, a na bieżąco prowadzona jest ewidencja ich zużycia. Materiały odniesienia stosowane podczas identyfikacji nicieni metodą morfologiczno-metryczną i zastosowaniem testów molekularnych posiadają właściwe oznakowanie kodowe oraz sporządzono ich wykaz.

Utylizacja odpadów powstałych w wyniku przygotowania próbek do badań oraz ekstrakcji i identyfikacji cyst prowadzone są w sposób prawidłowy.

Personel wykonujący poszczególne etapy badania posiada kompetencje właściwe do zakresu powierzonych zadań.

Nie stwierdzono uchybień w zakresie terminowości wykonywania analiz oraz udokumentowania ekstrakcji cyst i ich identyfikacji metodą morfologiczno-metryczną i z zastosowaniem testów molekularnych oraz wystawiania „Sprawozdań z badań”.

Działania podjęte w ramach realizacji do zaleceń sformułowanych po kontroli problemowej przeprowadzonej w dniu 29 października 2008 r. , dotyczącej oceny działalności diagnostycznej w zakresie poprawności wdrożenia metody FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) do badań bulw ziemniaka na obecność bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, należy uznać za właściwe.

#### **W związku z powyższym zobowiązuję do:**

- zapewnienia, by próbki gleby do badań w kierunku obecności mątwików tworzących cysty na ziemniaku pobierane były z właściwej głębokości (do 10 cm);
- właściwego oznakowania miejsc magazynowania próbek gleby w komórkach organizacyjnych WIORiN w Poznaniu przed ich wysyłką do laboratorium;
- umieszczania na protokołach pobierania prób dotyczących próbek gleby pobieranych z pól, na których uprawiane są ziemniaki inne niż sadzeniaki, informacji pozwalających na jednoznaczną identyfikację celu przeprowadzenia urzędowej kontroli, w tym przypadku badań o charakterze monitoringowym;
- umieszczania w dokumentacji komórek organizacyjnych WIORiN w Poznaniu kopii dokumentu „Informacja o wyniku badania laboratoryjnego”, którego oryginał jest przesyłany do Zleceniodawcy;

- w przypadku znaczącego wzrostu liczby próbek cyst mątwików poddawanych analizom z zastosowaniem testów molekularnych, zaopatrzenia pracowni PCR Laboratorium Wojewódzkiego w Poznaniu w komorę z laminarnym przepływem powietrza lub wydzielenia osobnego pomieszczenia do przygotowywania mixu do PCR;
- prowadzenia zapisów dotyczących czasu pracy lamp UV stosowanych podczas sterylizacji pomieszczeń pracowni PCR;
- sprawdzania skuteczności sterylizacji pomieszczeń pracowni PCR przez zastosowanie kontroli środowiskowej w tygodniu, w którym wykonywano badania.

Informację o sposobie realizacji zaleceń proszę przedłożyć do dnia 10 sierpnia 2013 r.

*Tadeusz Kłos*

Główny Inspektor

Załącznik 1

WOLENDOŹCI INSPEKTORAT OCHRONY  
ROSLIN I NASZCZEPNIWA W POZRARIU  
ODZIAL WE WRZESNI  
62-309 3024/62-3104-11 Główny Słownik 500 31  
52-743 506 31-435 17 31  
REGON 53479567 NIP 53-21-72-411 11

Pracownia ogrodnicza w OROK

Znak sprawy: EWRI.ML.AO.AFS.2012  
KOP. 7.12.1.2.8.1012

PROTOKÓŁ POBRANIA PRÓBEK NR 10.05.17.12

Próbki roślin, produktów roślinnych lub przedmiotów pobrane w czasie kontroli przeprowadzonej w dniu/dniach 16.05.2012  
u podmiotu Plantek Krotki, ul. Raciborska 39, 62-330 Krotki m. Rybnik, 30/00/2449

(inicjał, numer, adres, adres i adres)

przez Karolinę Szymek-Jasniak - specjalistę ds. fitopatologii w Plantek Krotki w Plantek Krotki w obecności Plantek Krotki

Lp.	Kolejność numery próbek	Koszt/probki roślinny/probki	Kraj pochodzenia/ miejsce pobrania próbki(*)	Nr partii	Wielkość partii	Wielkość poszczególnej próbki	Badanie na obecność
1	1-2	1,0 kg 100% - 100% - 100%	Polonia nr 82/1	-	100%	2x 200 mL	100% - 100% - 100%

## Załącznik 2



Pomieszczenie pracowni PCR Laboratorium Wojewódzkiego w Poznaniu; od lewej: stanowiska do izolacji DNA, nakładania matryc i amplifikacji.



Pomieszczenie pracowni PCR Laboratorium Wojewódzkiego w Poznaniu: stanowisko do przygotowania mixu PCR.