



SLOVENSKI STANDARD
oSIST prEN ISO 18743:2013
01-september-2013

Mikrobiologija živil in krme - Ugotavljanje prisotnosti ličink Trichinella v mesu - Metoda s prebavo (ISO/DIS 18743:2013)

Microbiology of food and animal feed - Detection of Trichinella Larvae in meat - Physical method by digestion (ISO/DIS 18743:2013)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Nachweis von Trichinellenlarven aus Fleischproben - Physikalisches Verdauungsverfahren (ISO/DIS 18743:2013)

Microbiologie des aliments - Recherche des larves de Trichinella dans la viande - Methode physique par digestion (ISO/DIS 18743:2013)

Ta slovenski standard je istoveten z: prEN ISO 18743

ICS:

07.100.30 Mikrobiologija živil Food microbiology

oSIST prEN ISO 18743:2013 **de**

EUROPÄISCHE NORM
EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE

ENTWURF
prEN ISO 18743

Juli 2013

ICS 07.100.30

Deutsche Fassung

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Nachweis
von Trichinellenlarven aus Fleischproben - Physikalisches
Verdauungsverfahren (ISO/DIS 18743:2013)

Microbiology of food and animal feed - Detection of
Trichinella Larvae in meat - Physical method by digestion
(ISO/DIS 18743:2013)

Microbiologie des aliments - Recherche des larves de
Trichinella dans la viande - Methode physique par digestion
(ISO/DIS 18743:2013)

Dieser Europäische Norm-Entwurf wird den CEN-Mitgliedern zur parallelen Umfrage vorgelegt. Er wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 erstellt.

Wenn aus diesem Norm-Entwurf eine Europäische Norm wird, sind die CEN-Mitglieder gehalten, die CEN-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist.

Dieser Europäische Norm-Entwurf wurde vom CEN in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch) erstellt. Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum des CEN-CENELEC mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevante Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Warnvermerk : Dieses Schriftstück hat noch nicht den Status einer Europäischen Norm. Es wird zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt. Es kann sich noch ohne Ankündigung ändern und darf nicht als Europäischen Norm in Bezug genommen werden.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
4.1 Allgemeingültiges	6
4.2 Probenumfang.....	6
4.3 Zerkleinern/Wolfen der Muskelprobe	6
4.4 Herstellung der Verdauungsflüssigkeit.....	6
4.5 Verdauung des zerkleinerten Fleisches	6
4.6 Filtration der Verdauungsflüssigkeit	7
4.7 Sedimentation der Verdauungsflüssigkeit.....	7
4.8 Mikroskopische Untersuchung	7
4.9 Verifizierung von Befunden	7
5 Reagenzien	7
6 Geräte.....	8
7 Probenahme, Kennzeichnu Mächenweite nicht regelmäßig kalibriert zu werden.	9
7.1 Sedimentation der Verdauungsflüssigkeit in einem Scheidetrichter.....	9
7.2 Sammeln des primären und sekundären Sediments	9
7.3 Mikroskopische Untersuchung	9
8 Dokumentation.....	10
9 Auswertung	10
10 Sicherheitsmaßnahmen	10
Anhang A (normativ) Probenahme.....	11
Anhang B (normativ) Gefrorene Proben	13
Anhang C (informativ) Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung.....	14
Anhang D (informativ) Beispiel für ein Labor-Arbeitsblatt zur Aufzeichnung von Daten bei der Untersuchung von Sammelproben durch den Verdauungstest	16
Literaturhinweise	17

Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18743:2013) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 18743:2013 wurde vom CEN als prEN ISO 18743:2013 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[SIST EN ISO 18743:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/dc216e3b-0891-4aaa-8a8d-87dfde85a03a/sist-en-iso-18743-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/dc216e3b-0891-4aaa-8a8d-87dfde85a03a/sist-en-iso-18743-2015>

Einleitung

Trichinella spp. sind die Verursacher der Trichinellose beim Menschen, einer Erkrankung, die eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit darstellt und als Folge davon auch ein wirtschaftliches Problem in der Schweineerzeugung. Aufgrund der zoonotischen Bedeutung dieser Infektion in vielen Ländern konzentrieren sich die Bemühungen hauptsächlich auf Bekämpfung und/oder Tilgung von *Trichinella* bei Hausschweinen, die die wichtigste Quelle für Infektionen beim Menschen weltweit sind. Verdauungsverfahren zum Nachweis von *Trichinella*-Larven in Muskelproben von Schweinen und anderen empfänglichen Tierarten, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind (z. B. Pferde, Wildschweine, Walrosse und Bären), können zur Vorbeugung einer klinischen Trichinellose beim Menschen angewendet werden, jedoch nicht zur Vorbeugung einer Infektion.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[SIST EN ISO 18743:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/dc216e3b-0891-4aaa-8a8d-87dfde85a03a/sist-en-iso-18743-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/dc216e3b-0891-4aaa-8a8d-87dfde85a03a/sist-en-iso-18743-2015>

1 Anwendungsbereich

In der vorliegenden Internationalen Norm wird ein Verfahren festgelegt, das zum Nachweis von Larven von *Trichinella* spp. in der Muskelphase (Muskellarven) im Fleisch von einzelnen Schlachttierkörpern, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, angewendet werden kann. Es ist anwendbar zur Untersuchung von Fleisch von Haus- und Wildtierarten (aus dem domestischen und silvatischen Zyklus), die mit Nematoden der Gattung *Trichinella* infiziert sein können.

Dieses Verfahren ermöglicht keine Bestimmung der Art oder des Genotyps der nachgewiesenen Parasiten; eine Identifizierung kann mit molekularen Verfahren erfolgen.

Das in dieser Internationalen Norm beschriebene Verfahren ist in Verbindung mit den Leitlinien im OIE-Diagnosehandbuch und von der ICT zur Untersuchung auf *Trichinella* und zur Kontrolle von Schlachttierkörpern, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, anzuwenden, sofern nicht auf andere Weise nachgewiesen wurde, dass das Tier kein Risiko bezüglich einer *Trichinella*-Exposition darstellte.

Das Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung wird als „Goldstandard“ (Maßstab) angesehen, weil in Validierungsstudien nachgewiesen wurde, dass es zu den zuverlässigsten Ergebnissen führt.

Vorausgesetzt, dass die Gleichwertigkeit mit dem in dieser Internationalen Norm beschriebenen Verfahren dokumentiert werden kann, dürfen alternative Verfahren zur Analyse angewendet werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

OIE, World Organization for Animal Health (2012), Chapter 2.1.16 — Trichinellosis. In : Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [EN ISO 18743:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/dc216e3b-0891-4aaa-8a8d-)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/dc216e3b-0891-4aaa-8a8d->
ICT (International Commission on Trichinellosis), (2012). ICT Quality Assurance in Digestion Testing Programs for Trichinella. In: ICT Recommendations and Guidelines. <http://trichinellosis.org/Guidelines.html>

ISO 7218:2007, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Muskellarve (ML) von *Trichinella*

erstes Larvenstadium (L1) von Nematoden, die zur Gattung *Trichinella* gehören, das weltweit in der quer gestreiften Muskulatur (Skelettmuskeln) von Tieren zu finden ist und wodurch Menschen infiziert werden können. Diese Larven sind etwa 0,7 mm bis 1,1 mm lang und 0,03 mm breit

3.2

Verdauungstest

Verfahren zum Nachweis von *Trichinella*-Larven in Muskelgewebe durch einen enzymatischen Verdauungsschritt zur Freisetzung der Larven aus Muskelgewebe mit anschließender Filtration und Sedimentationsschritten sowie Nachweis der isolierten Larven mittels Mikroskopie

prEN ISO 18743:2013 (D)

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeingültiges

Das Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben, das als das internationale Referenzverfahren anerkannt ist, beruht auf dem enzymatischen Aufschluss von Muskelfasern in einer aus Pepsin und Salzsäure bestehenden Flüssigkeit, gefolgt von einer Reihe von Sedimentations- und Waschschritten. Gleichwertige validierte Verfahren können ebenfalls angewendet werden. Die Leistungsfähigkeit der Untersuchung wird stark durch den Probenumfang (1 g Probe ermöglicht den zuverlässigen Nachweis von Infektionen von ≥ 3 Ipg und 3 g bis 5 g Probe ermöglichen den zuverlässigen Nachweis von ≥ 1 Ipg), die Art des gewählten Muskels, das angewendete Verfahren und die Fertigkeiten des die Untersuchung durchführenden Fachpersonals beeinflusst. Eine Empfindlichkeit von mindestens 1 bis 3 Larven je Gramm muss erreicht werden. Folglich sollte ein entsprechender Umfang einer Muskelprobe von einem Prädilektionsmuskel des zu untersuchenden Tieres entnommen werden. Es gibt keine internen Qualitätskontrollen, die bei der Durchführung des Verfahrens eingesetzt werden können. Einige Schlüsselemente bei seiner grundsätzlichen Anwendung sind folgende:

4.2 Probenumfang

Zur Untersuchung einzelner Schlachtkörper von als Nahrungsmittel dienenden Tieren zu Zwecken der öffentlichen Gesundheit muss sich der zu untersuchende Probenumfang nach dem Risiko richten, bestimmt durch eine zuständige Behörde (siehe Anhang A), er darf jedoch nicht weniger als ein Gramm betragen.

4.3 Zerkleinern/Wolfen der Muskelprobe

Fleischproben werden mit einem Mixer oder Fleischwolf zerkleinert, um die Oberfläche für den enzymatischen Abbau zu erhöhen. Die Verfahrensweise beim Zerkleinern oder Wolfen muss so angepasst werden, dass ein maximaler Wirkungsgrad der Verdauung erreicht wird.

ANMERKUNG Ein zu geringes Zerkleinern oder Wolfen bedingt möglicherweise eine mangelhafte Verdauung, während ein zu starkes Zerkleinern oder Wolfen die Muskellarven zerstören kann.

4.4 Herstellung der Verdauungsflüssigkeit

Pepsin ist im Handel als Pulver, Granulat und in flüssiger Form erhältlich. Die Aktivität von Pepsin muss zertifiziert sein und das Pepsin ist entsprechend den Empfehlungen des Herstellers zu lagern.

ANMERKUNG Die Verwendung einer flüssigen Pepsin-Formulierung kann vorteilhaft sein, da sie die Gefahr eines Berufsrisikos, wie z. B. einer allergischen Reaktion, des Laborpersonals vermindern kann.

4.5 Verdauung des zerkleinerten Fleisches

Lebensfähige *Trichinella*-Larven sind resistent gegenüber der Pepsin-HCl-Verdauungsflüssigkeit und können deshalb frei aus dem Muskelgewebe isoliert werden. Tote *Trichinella*-Larven werden möglicherweise durch die künstliche Verdauung zerstört.

Um eine wirksame und schnelle Verdauung zu erleichtern, müssen im Verlauf des Prozesses ein maximales Verhältnis von Fleisch zur Verdauungsflüssigkeit von 1:20 und eine Temperatur von (45 ± 2) °C aufrechterhalten werden. Die für die Verdauung erforderliche Zeit muss mindestens 30 min betragen, im Fall von schwerer verdaubaren Muskelproben, wie z. B. von Schlachtkörpern von Wildtieren, oder die Zunge von vielen Tierarten (siehe Anhang A), sollte die Verdauungszeit erhöht werden, sie darf jedoch insgesamt 60 min nicht überschreiten.

ANMERKUNG Wenn die Bedingungen in Bezug auf Zeit und Temperatur unterhalb der geforderten Werte liegen, erfolgt möglicherweise eine unvollständige Verdauung des Muskelgewebes. Umgekehrt kann eine erhöhte Temperatur (über 50 °C) oder eine längere Verdauungszeit zur Zerstörung der Larven oder zur Inaktivierung von Pepsin führen.

4.6 Filtration der Verdauungsflüssigkeit

Nach der Verdauung muss die Verdauungsflüssigkeit durch ein Sieb mit einer bestimmten Maschenweite (6.11) filtriert werden, mit dem unverdautes Gewebe zurückgehalten wird, durch das die Larven jedoch hindurchgehen. Die Siebe müssen vor dem Gebrauch frei von Ablagerungen sein und vorher angefeuchtet werden, um einen schnellen Durchgang der Verdauungsflüssigkeit zu ermöglichen.

4.7 Sedimentation der Verdauungsflüssigkeit

Die Sedimentation der Larven erfolgt in einem Scheidetrichter (primäre Sedimentation) und einem Glasröhrchen (sekundäre Sedimentation). Die Larven werden in diesen primären und sekundären Sedimenten gesammelt. Die Sedimentationszeiten müssen 30 min und 10 min bei der primären bzw. sekundären Sedimentation betragen (zur Sedimentationszeit bei gefrorenen Muskelproben siehe Anhang B). Wenn die Sedimentationszeit kürzer ist als vorstehend festgelegt, sedimentieren sich möglicherweise nicht alle Larven ab und werden im gesammelten Sediment nicht wiedergefunden.

4.8 Mikroskopische Untersuchung

Bei der mikroskopischen Untersuchung des sekundären Sediments können qualifizierte Analytiker *Trichinella*-Larven erkennen und von anderen Nematoden, Organismen und Artefakten unterscheiden. Für die Qualifizierung muss der Analytiker das Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung unter Verwendung von mit *Trichinella* gespikten Proben ordnungsgemäß durchführen (Gruppe zur Leistungsprüfung), um die Larven problemlos zu isolieren und zu identifizieren. Die Kenntnis der grundlegenden morphologischen Eigenschaften von *Trichinella*-Larven, einschließlich der Größe (0,7 mm bis 1,1 mm lang und 0,3 mm breit), Form und Farbe, ist für die Untersuchung des Sediments erforderlich (siehe Bilder in Anhang C). Das charakteristischste Merkmal von *Trichinella*-Larven, das nicht mit dem Stereomikroskop erkannt wird, sondern mit einem zusammengesetzten Mikroskop (Verbundmikroskop), ist das Stichosom, das aus einer Reihe von diskoidalen Zellen besteht, die den Ösophagus auskleiden und die vordere Hälfte des Körpers einnehmen. *Trichinella*-Larven können in eingerollter (bei Kälte) oder beweglicher Form (bei Wärme) auftreten bzw. C-förmig sein, wenn sie tot sind.

Analytiker sollten, basierend auf der Durchführung von Leistungsprüfungen nach der Anleitung der Internationalen Kommission für Trichinellose (International Commission on Trichinellosis) — <http://www.trichinellosis.org/Guidelines.html> — qualifiziert sein.

4.9 Verifizierung von Befunden

Wenn positive oder nicht eindeutige Befunde auftreten, sollte eine Bestätigung und Identifizierung der *Trichinella*-Art durch ein qualifiziertes Referenzlabor erfolgen.

5 Reagenzien

Die benötigten Reagenzien sind:

5.1 Leitungswasser, erwärmt auf (47 ± 2) °C.

5.2 Salzsäure (25%ig, Stoffmengenkonzentration (Molarität): 7,8 bis 7,9, oder ein beliebiger anderer prozentualer Gehalt).

5.3 Pepsin (Pulver oder Granulat: 1:10 000 NF, 1:12 500 BP, 2 000 FIP; Flüssigkeit: 660 U/ml).

ANMERKUNG Die Aktivität von Pepsin in Pulverform wird entweder in „NF“ (US National Formulary), „BP“ (British Pharmacopoea) oder „FIP“ (Fédération Internationale de Pharmacie) angegeben, die Aktivität von Pepsin in flüssiger Form wird in Einheiten/ml nach dem Europäischen Arzneibuch angegeben. Andere Aktivitäten von Pepsin können verwendet werden, vorausgesetzt, die endgültige Aktivität in der Verdauungsflüssigkeit entspricht der Aktivität von 10 g mit 1:10 000 NF.

5.4 Ethanol (70 % bis 90 % Ethylalkohol).

prEN ISO 18743:2013 (D)**6 Geräte**

Übliche mikrobiologische Laborausrüstung (siehe ISO 7218) und insbesondere Folgendes:

- 6.1** Gekennzeichnete flache Sammelbehälter oder Kunststoffbeutel für Proben.
- 6.2** Messer, Schere und Pinzette zum Schneiden von Proben und Entfernen von nicht verdaulichem Gewebe.
- 6.3** Kalibrierte Waage zum Einwiegen von Proben und/oder Pepsin (mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ g).
- 6.4** Mixer aus Glas, Kunststoff oder Stahl mit scharfem Schneidmesser (regelmäßig kontrolliert und/oder ausgetauscht).
- 6.5** Magnetrührer mit einer einstellbaren Heizplatte oder in einem Brutschrank angeordneter Magnetrührer.
- 6.6** Thermometer (mit einer Genauigkeit von mindestens $\pm 0,5$ °C, Temperaturbereich mindestens von 20 °C bis 70 °C).
- 6.7** Rührstab (5 cm lang).
- 6.8** Bechergläser (Fassungsvermögen mindestens 3 l).
- 6.9** Aluminiumfolie oder Deckel zum Abdecken der Bechergläser.
- 6.10** Trichter aus Glas, Kunststoff oder Stahl (Mindestdurchmesser etwa 15 cm oder größer).
- 6.11** Sieb aus Messing oder nichtrostendem Stahl, spezifische Maschenweite zwischen 180 μm und 200 μm (Durchmesser etwa 10 cm oder größer).
- 6.12** Konische Scheidetrichter aus Glas (Fassungsvermögen mindestens 2,5 l), vorzugsweise mit Teflonstopfen (Sicherheitsverschluss).
- 6.13** Röhrchen oder Messzylinder (50 ml oder 100 ml, Glas).
- 6.14** Petrischalen (Durchmesser etwa 9 cm), mit einem Raster aus Quadraten von etwa 1 cm, oder eine gleichwertige Vorrichtung zum Auszählen der Larven.
- 6.15** Stereomikroskop mit in der Intensität einstellbarer Durchlichtquelle oder Trichinoskop mit Horizontal-tisch. Eine Möglichkeit zur Bilderfassung und -speicherung (Kamera) wird zur Dokumentation nicht eindeutiger Ergebnisse empfohlen, ist jedoch nicht erforderlich.
- 6.16** Pipetten (1 ml, 10 ml und 25 ml).
- 6.17** Kleine Glasfläschchen zum Sammeln von isolierten Larven.

Becher oder Scheidetrichter sollten nicht aus Kunststoff oder Teflon bestehen, da eine raue Oberfläche und elektrostatische Aufladung dazu beitragen können, dass Larven an der Innenfläche der Ausrüstung haften bleiben.