
Mikrobiologija v prehranski verigi - Metode ugotavljanja prisotnosti ličink Anisakidae L3 v ribah in ribjih proizvodih – 2. del: Metoda umetne prebave (ISO 23036-2:2021)

Microbiology of the food chain - Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products - Part 2: Artificial digestion method (ISO 23036-2:2021)

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Verfahren zum Nachweis von Anisakidae L3-Larven in Fisch und Fischereierzeugnissen - Teil 2: Verfahren der künstlichen Verdauung (ISO 23036-2:2021)

Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthodes de recherche des larves L3 d'Anisakidae dans les poissons et produits de la pêche - Partie 2: Méthode de digestion artificielle (ISO 23036-2:2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/442f29d5-f3f2-453c-81ff-f88b0f96413a/sist-en-iso-23036-2-2021>

Ta slovenski standard je istoveten z: EN ISO 23036-2:2021

ICS:

07.100.30	Mikrobiologija živil	Food microbiology
67.120.30	Ribe in ribji proizvodi	Fish and fishery products

SIST EN ISO 23036-2:2021**en,fr,de**

**iTeh STANDARD
PREVIEW
(standards.iteh.ai)**

[SIST EN ISO 23036-2:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/442f29d5-f3f2-453c-81ff-f88b0f96413a/sist-en-iso-23036-2-2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/442f29d5-f3f2-453c-81ff-f88b0f96413a/sist-en-iso-23036-2-2021>

EUROPÄISCHE NORM
EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE

EN ISO 23036-2

Mai 2021

ICS 07.100.30

Deutsche Fassung

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Verfahren zum
Nachweis von Anisakidae L3-Larven in Fisch und
Fischereierzeugnissen - Teil 2: Verfahren der künstlichen
Verdauung (ISO 23036-2:2021)

Microbiology of the food chain - Methods for the
detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery
products - Part 2: Artificial digestion method (ISO
23036-2:2021)

Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthodes de
recherche des larves L3 d'Anisakidae dans les poissons
et produits de la pêche - Partie 2: Méthode de digestion
artificielle (ISO 23036-2:2021)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 24. März 2021 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-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. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

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

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



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
4.1 Allgemeines	7
4.2 Probenumfang	7
4.3 Vorbereitung der Probe	7
4.4 Verdauung der Probe	7
4.5 Filtration der Verdauungsflüssigkeit	7
4.6 Verifizierung der Ergebnisse	7
5 Reagenzien	8
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	8
7 Probenahme	9
8 Durchführung	9
8.1 Vorbereitung der Probe	9
8.2 Herstellung der Verdauungsflüssigkeit	9
8.3 Verdauung der Probe im Becherglas	10
8.4 Filtration der Verdauungsflüssigkeit	10
8.5 Mikroskopische Untersuchung	11
9 Angabe der Ergebnisse	11
10 Leistungsmerkmale des Verfahrens	11
11 Untersuchungsbericht	11
12 Qualitätssicherung	11
Anhang A (informativ) Probenahme	12
Anhang B (informativ) Beispiel für ein Labor-Arbeitsblatt zur Aufzeichnung von Daten bei der Prüfung von Fischfilets mittels künstlicher Verdauung	13
Literaturhinweise	14

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 23036-2:2021) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2021, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2021 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 23036-2:2021 wurde von CEN als EN ISO 23036-2:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

[SIST EN ISO 23036-2:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/442f29d5-f3f2-453c-81ff-f88b0f96413a/sist-en-iso-23036-2-2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/442f29d5-f3f2-453c-81ff-f88b0f96413a/sist-en-iso-23036-2-2021>

EN ISO 23036-2:2021

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 275^{N1}, *Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 23036 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

^{N1} Nationale Fußnote: Fehler in der Referenzfassung, dieses Dokument wurde in Zusammenarbeit mit dem CEN/TC 463, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette* erarbeitet.

Einleitung

Nematoden der Familie Anisakidae haben einen komplexen Lebenszyklus, der eine Vielzahl von Wirtstieren umfasst. Adulte Vertreter der Anisakidae leben im Magen von Meeressäugern, wo sie sich in die Schleimhaut einbetten. Von den adulten Weibchen produzierte, nicht embryonierte Eier werden mit den Fäkalien der Meeressäuger ausgeschieden und im Meerwasser embryoniert, sodass sich Larven des ersten Stadiums (L1) in den Eiern entwickeln. Die Larven häuten sich und werden zu freischwimmenden Larven des zweiten Stadiums (L2). Werden sie von Krebstieren gefressen, entwickeln sie sich zu Larven des dritten Stadiums (L3). In diesem Stadium sind sie infektiös für Fische und Kalmare. Durch Prädation werden die Larven von Fisch zu Fisch übertragen, wobei sie im L3 Stadium verbleiben. Manche Larven wandern aus der Bauchhöhle ins Muskelgewebe. Menschen sind Fehlwirte. Sie können sich durch den Verzehr von rohen oder nicht ausreichend gegarten Fischen und Kopffüßern, die lebensfähige L3 enthalten, infizieren.

Nematoden der Familie Anisakidae sind Erreger der humanen Anisakidose, einer Krankheit, die nicht nur eine Gefahr für die Gesundheit der Bevölkerung darstellt, sondern auch zu wirtschaftlichen Problemen für Fischerei und Lebensmittelsicherheit führt (auch die Bezeichnung „Anisakiasis“ für die von Vertretern der Gattung Anisakis hervorgerufene Krankheit ist geläufig). Weltweit fungieren marine und freilebende anadrome Fische als Zwischenwirte der Anisakidae, dagegen sind Meeressäuger die Endwirte.

Um das Risiko, dass kontaminierte Fische beim Verbraucher ankommen, zu minimieren und damit das Auftreten von humaner Anisakidose zu verhindern, werden Sichtprüfungsverfahren zum Nachweis von Anisakidalarven in Fischen eingesetzt [1],[2].

Das UV Pressverfahren und die künstliche Verdauung von Fischmuskelgewebe sind speziell entwickelte Verfahren, um Nematodenlarven in Fischen nachzuweisen und das Ausmaß des Befalls einer Charge zu beurteilen. Beide Verfahren wurden in multizentrischen Ringversuchen validiert und geprüft [3] (siehe Abschnitt 10).

[SIST EN ISO 23036-2:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/442f29d5-f3f2-453c-81ff-f88b0f96413a/sist-en-iso-23036-2-2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/442f29d5-f3f2-453c-81ff-f88b0f96413a/sist-en-iso-23036-2-2021>

EN ISO 23036-2:2021

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für den Nachweis von L3-Anisakidaelarven, die häufig in marinen und anadromen Fischen vorkommen, fest. Das Verfahren ist anwendbar bei frischem und/oder gefrorenem Fisch sowie bei leicht verarbeiteten Fischprodukten, wie etwa marinierten, gesalzenen oder geräucherten Fischprodukten. Es ist auch als bestätigendes Verfahren bei einer Sichtprüfung von inneren Organen geeignet.

Das Verfahren der künstlichen Verdauung [4],[5],[6] ist anwendbar für die Quantifizierung parasitärer Infektionen durch Schätzung der Anzahl der in der Fischmuskulatur vorhandenen Parasiten. Bei der Anwendung mit frischem Fisch oder leicht verarbeiteten Fischprodukten (die vor der Verarbeitung nie eingefroren waren) kann zudem die Lebensfähigkeit der gegebenenfalls vorhandenen L3-Anisakidaelarven bestimmt werden.

Dieses Verfahren ist jedoch nicht für die Bestimmung der Art oder des Genotyps der nachgewiesenen Parasiten anwendbar. Eine endgültige Identifizierung erfolgt mittels morphologischer und/oder molekularer Verfahren.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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).

ISO 7218, *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.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1 L3-Anisakidaelarven
zur Familie der Anisakidae, insbesondere den Gattungen *Anisakis*, *Contracaecum* und *Pseudoterranova* gehörende Larven des dritten Stadiums (L3)

Anmerkung 1 zum Begriff: Aus praktischen Gründen kann auch die Gattung *Hysterothylacium*, die zur Familie Raphidascarididae gehört und bereits als Anisakidae klassifiziert wird, hierunter fallen.

3.2 Verfahren der künstlichen Verdauung
Verfahren zum Nachweis von Anisakidaelarven im Muskelgewebe von Fischen durch eine enzymatische Verdauung (mittels Pepsin/HCl-Lösung) zur Freisetzung der Larven aus dem Muskelgewebe mit anschließender Filtration und Nachweis der Larven mittels Mikroskopie

Anmerkung 1 zum Begriff: Wird dieses Verfahren bei frischem Fisch angewandt, ist es möglich, die Lebensfähigkeit der Larven zu überprüfen.

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Das Verfahren der künstlichen Verdauung beruht auf dem enzymatischen Abbau von Muskelfasern in einer aus Pepsin und Salzsäure bestehenden Flüssigkeit, gefolgt von Filtrations- und Waschstritten.

Mit diesem Verfahren ist eine Unterscheidung von toten und lebensfähigen Anisakidaelarven möglich, vorausgesetzt dass die Temperatur der Verdauungsflüssigkeit 37 °C nicht überschreitet (ausgenommen bei *Hysterothylacium* sp.-Larven, die bereits bei 37 °C sterben) und dass der Fisch vor der Prüfung nie eingefroren war.

Es gibt keine internen Qualitätskontrollen, die bei der Durchführung des Verfahrens angewendet werden können.

ANMERKUNG Alternative Verfahren können unter der Voraussetzung, dass nachgewiesen wurde, dass sie mit den in diesem Dokument beschriebenen Verfahren gleichwertig sind, für die Analyse verwendet werden.

4.2 Probenumfang

Bei der Prüfung von Fischereiprodukten aus Gründen der öffentlichen Gesundheit muss sich der Probenumfang nach dem durch die zuständigen Behörden bestimmten Risiko richten.

4.3 Vorbereitung der Probe

Um die Oberfläche für den enzymatischen Abbau zu vergrößern, werden die Proben vorsichtig zerkleinert. Dabei wird auf die Anwesenheit von Larven geachtet, damit diese nicht zerstört werden. Alternativ kann ein Smasher/Stomacher®¹, der den Verdauungsprozess erleichtert, ohne die Nematodenlarven zu beschädigen, verwendet werden.

Mixen oder Wolfen sollte vermieden werden, da hierdurch die Larven beschädigt oder zerstört werden können.

4.4 Verdauung der Probe

Lebensfähige Anisakidaelarven sind resistent gegenüber der Pepsin-HCl-Verdauungsflüssigkeit und können deshalb frei aus dem Muskelgewebe isoliert werden.

Für eine wirksame und schnelle Verdauung muss im Verlauf des Prozesses ein maximales Verhältnis von Fleisch zu Verdauungsflüssigkeit von 1 : 20 und eine Temperatur von 37 °C ± 2 °C aufrechterhalten werden. Die für die Verdauung erforderliche Zeit muss 15 min bis 30 min betragen. Bei schwerer verdaubaren Muskelproben sollte die Verdauungszeit erhöht werden. Jedoch darf sie, sofern nicht anderweitig für eine bestimmte Probenmatrix validiert, 45 min nicht überschreiten.

4.5 Filtration der Verdauungsflüssigkeit

Nach der Verdauung muss die Verdauungsflüssigkeit durch ein Sieb mit einer bestimmten Maschenweite (6.9) filtriert werden. Die aufgefangenen Larven müssen mit Leitungswasser gespült werden.

4.6 Verifizierung der Ergebnisse

Bei positiven oder unklaren Befunden sollte ein qualifiziertes Referenzlabor die Art mittels morphologischer und/oder molekularer Verfahren bestätigen und identifizieren.

1 Smasher und Stomacher® sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokumentes und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch ISO.

EN ISO 23036-2:2021

5 Reagenzien

5.1 Leitungswasser.

5.2 Salzsäure, 25%-ig.

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

Pepsin ist als Pulver, Granulat oder in flüssiger Form im Handel erhältlich. Die Aktivität des Pepsins muss bescheinigt sein. Das Pepsin muss den Empfehlungen des Herstellers entsprechend aufbewahrt werden.

Die Verwendung von flüssigem Pepsin kann von Vorteil sein, da so das Risiko für betriebsbedingte Gefahren, wie etwa allergische Reaktionen beim Laborpersonal, reduziert werden könnte.

ANMERKUNG Die Aktivität von Pepsin in Pulverform wird je Gramm entweder in „NF“ (US National Formulary), „BP“ (British Pharmacopoeia) oder „FIP“ (Fédération Internationale de Pharmacie) angegeben. Die Aktivität von Pepsin in flüssiger Form wird in Einheiten je Milliliter nach dem Europäischen Arzneibuch mit einem Minimum von 660 U/ml angegeben. Andere Pepsinaktivitäten können verwendet werden, vorausgesetzt die endgültige Aktivität in der Verdauungsflüssigkeit entspricht der Aktivität von 10 g mit 1 : 10 000 NF.

5.4 Ethanol, 90%-ig.

5.5 Säurelösung, 1 % Essigsäure.

6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Üblichen Grundausstattung mikrobiologischer Labore in Übereinstimmung mit ISO 7218 und insbesondere Folgendes.

6.1 Gekennzeichnete flache Sammelbehälter oder Kunststoffbeutel für die Proben.

6.2 Messer, Schere und Pinzette zum Zerteilen der Proben.

6.3 Kalibrierte Waage zum Einwiegen von Proben und/oder Pepsin mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ g.

6.4 Magnetrührer mit einer regulierbaren Heizplatte oder in einen Inkubator platzierter Magnetrührer.

6.5 Dreieckiger Rührstab mit Beschichtung aus Polytetrafluorethylen (PTFE) mit einer Mindestlänge von 5 cm.

6.6 Thermometer mit einer Fehlergrenze von mindestens $\pm 0,5$ °C, Temperaturbereich mindestens von 20 °C bis 70 °C.

6.7 Bechergläser mit geeignetem Fassungsvermögen.

6.8 Aluminiumfolie oder -deckel zum Abdecken der Bechergläser.

6.9 Sieb aus Messing oder nichtrostendem Stahl, Maschenweite ungefähr 180 Mikrometer bis 500 Mikrometer, mit einem Durchmesser von etwa 10 cm oder mehr.

6.10 Petrischalen mit einem Durchmesser von etwa 90 mm zum Auszählen der Larven.

6.11 Kleine Glasfläschchen zum Sammeln der isolierten Larven.

6.12 Stereomikroskop mit einstellbarem Durchlicht.