

DIN EN ISO 18744

ICS 07.100.30

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Nachweis und Zählung von Cryptosporidium und Giardia in frischem
grünem Blattgemüse und Beeren (ISO 18744:2016);
Deutsche Fassung EN ISO 18744:2016**

Microbiology of the food chain –

Detection and enumeration of Cryptosporidium and Giardia in fresh leafy green vegetables
and berry fruits (ISO 18744:2016);

German version EN ISO 18744:2016

Microbiologie de la chaîne alimentaire –

Recherche et dénombrement des Cryptosporidium et Giardia dans les légumes verts frais à
feuilles et les fruits à baies (ISO 18744:2016);

Version allemande EN ISO 18744:2016

Gesamtumfang 30 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 18744:2016) enthält unverändert die internationale Norm ISO 18744:2016, die vom Unterkomitee SC 9 „Microbiology“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) erarbeitet wurde. Auf Grund des Beschlusses des CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) wurde die Bearbeitung im parallelen Abstimmungsverfahren unter Federführung des ISO/TC 34/SC 9 durchgeführt.

Die Mitarbeit des DIN im SC 9 „Microbiology“ des ISO/TC 34 und in der Arbeitsgruppe 6 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ des CEN/TC 275 wurde über den Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 16140	siehe DIN EN ISO 16140

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 16140, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren*

Deutsche Fassung

Mikrobiologie der Lebensmittelkette —
Nachweis und Zählung von *Cryptosporidium* und *Giardia*
in frischem grünem Blattgemüse und Beeren
(ISO 18744:2016)

Microbiology of the food chain —
Detection and enumeration of *Cryptosporidium*
and *Giardia* in fresh leafy green vegetables
and berry fruits
(ISO 18744:2016)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —
Recherche et dénombrement des *Cryptosporidium* et
Giardia dans les légumes verts frais à feuilles et
les fruits à baies
(ISO 18744:2016)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 11. März 2016 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 Management-Zentrum des CEN-CENELEC 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, 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.



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

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

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	3
Vorwort.....	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen.....	6
3 Begriffe.....	6
4 Kurzbeschreibung.....	7
5 Reagenzien.....	7
6 Geräte.....	8
7 Probenahme und Transport.....	9
7.1 Probenahme.....	9
7.2 Transport.....	9
7.3 Annahme der Proben.....	9
7.4 Lagerung.....	9
7.5 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	9
8 Durchführung.....	10
8.1 Entfernen der Parasiten von grünem Blattgemüse.....	10
8.2 Entfernen der Parasiten von Beeren.....	11
8.3 Immunomagnetische Trennung (en: Immunomagnetic separation, IMS).....	12
8.4 Färbung der Proben.....	13
8.5 Mikroskopie.....	14
9 Verfahren der Qualitätslenkung.....	19
9.1 Allgemeines.....	19
9.2 Einbeziehung und Auswertung von Kontrollen.....	19
9.3 Reinigung der Ausrüstung.....	19
10 Bekanntgabe der Ergebnisse.....	19
10.1 Angabe der Ergebnisse.....	19
10.2 Prüfbericht.....	20
Anhang A (normativ) Herstellung der Reagenzien.....	21
Anhang B (normativ) Herstellung von Suspensionen für die positive Prozesskontrolle.....	23
Anhang C (informativ) Mit den Verfahren erreichte prozentuale Wiederfindungsraten.....	25
Literaturhinweise.....	27

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 18744:2016) 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.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2016, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2016 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können, ohne dass diese vorstehend identifiziert wurden. CEN [und/oder] CENELEC sind 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 ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 18744:2016 wurde vom CEN als EN ISO 18744:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen 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. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien 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 empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9 *Microbiology*.

Einleitung

Cryptosporidium spp. und *Giardia duodenalis* (Synonyme: *G. lamblia*, *G. intestinalis*) sind protozoische Parasiten, die beim Menschen Darmerkrankungen verursachen können. Beide Organismen sind durch ein widerstandsfähiges Übertragungsstadium, die *Cryptosporidium*-Oozyste und die *Giardia*-Zyste, charakterisiert, die in feuchten Umgebungen über längere Zeiträume überleben können. Diese Übertragungsstadien werden nachstehend gemeinsam als (Oo)Zysten bezeichnet. Insbesondere *Cryptosporidium*-Oozysten sind in hohem Maße resistent gegenüber Chlor in Konzentrationen, wie sie für die Aufbereitung von Trinkwasser angewendet werden, und die chemische Desinfektion von grünem Blattgemüse und Beeren, falls sie während der Verarbeitung durchgeführt wird, ist möglicherweise auch wirkungslos. Folglich zeigt das Fehlen von vegetativen Bakterien auf Frischwaren als Indikatoren für fäkale Verunreinigung nicht unbedingt das Fehlen von (Oo)Zysten an. Es gibt kein praktisches Verfahren zur Kultivierung von *Cryptosporidium* spp. und *Giardia duodenalis* für Nachweiszwecke und deshalb muss zum Nachweis einer Kontamination mit diesen Parasiten eine direkte Gewinnung der (Oo)Zysten von der Lebensmittelprobe erfolgen, gefolgt von Visualisierung der (Oo)Zysten durch Mikroskopie. Die in der vorliegenden Internationalen Norm beschriebenen Verfahren dienen der Feststellung, ob *Cryptosporidium*- und/oder *Giardia*-(Oo)Zysten auf den Oberflächen von Frischwaren vorhanden sind, und deren Zählung. Diese Internationale Norm beruht auf veröffentlichten Verfahren, die in einem multizentrischen Ringversuch geprüft worden sind. Alternative Verfahren können nach einem Nachweis ihrer Gleichwertigkeit mit dieser Internationalen Norm nach der in ISO 16140 [1] beschriebenen Arbeitsvorschrift angewendet werden.

WARNUNG — Personen, die diese Internationale Norm anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Internationale Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle möglicherweise mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsaspekte angesprochen werden. Es obliegt der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Gesundheitsschutzmaßnahmen zu treffen und die Einhaltung der nationalen gesetzlichen Bestimmungen sicherzustellen.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten auf oder in Lebensmitteln, die hier als frisches grünes Blattgemüse und Beeren beschrieben werden, fest. Mit geeigneten Kontrollen ist es möglicherweise auch für die Untersuchung anderer Frischwaren geeignet.

Die Beschreibungen für die Mikroskopie sind für Oozysten von *Cryptosporidium* spp. und Zysten von *Giardia duodenalis* in den Größenbereichen, die die Arten (*Cryptosporidium*) oder Genogruppen (*Giardia*) einschließen, die als pathogen für den Menschen bekannt sind.

Dieses Verfahren schließt keine molekulare Analyse ein und ist deshalb nicht zur Bestimmung der Arten oder Genotypen/Genogruppen von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten geeignet. Mit dem Verfahren werden alle Arten und Genotypen/Genogruppen nachgewiesen, die als pathogen für den Menschen bekannt sind, und auch andere, die das nicht sind. Zur weiteren Identifizierung sind molekulare Typisierungstests erforderlich. Diese können jedoch nicht zuverlässig durchgeführt werden, wenn die Proben mit positiven Prozesskontrollen beimpft (en: spiked) wurden, da das Ergebnis von molekularen Typisierungstests verschleiert wird.

Dieses Verfahren ermöglicht keine Bestimmung der Lebensfähigkeit oder Infektiosität beliebiger möglicherweise vorhandener *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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).

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

***Cryptosporidium*-Oozyste**

Übertragungsstadium von *Cryptosporidium* spp.

Anmerkung 1 zum Begriff: Ihr Nachweis beruht auf der Reaktion mit spezifischen Anti-*Cryptosporidium*-Antikörpern und auf morphologischen Merkmalen, wie in Abschnitt 8 beschrieben.

3.2***Giardia*-Zysten**

Übertragungsstadium von *Giardia* spp.

Anmerkung 1 zum Begriff: Ihr Nachweis beruht auf der Reaktion mit spezifischen Anti-*Giardia*-Antikörpern und auf typischen morphologischen Merkmalen, wie in Abschnitt 8 beschrieben.

3.3**frisches grünes Blattgemüse**

Pflanzenblätter, die als Gemüse gegessen werden und die mit Ausnahme von möglicherweise Schneiden und Waschen keinem Aufbereitungsprozess unterzogen wurden

3.4**frische Beere**

kleine, runde oder längliche, fleischige und saftreiche Frucht, die mit Ausnahme von möglicherweise Schneiden und Waschen keinem Aufbereitungsprozess unterzogen wurde

3.5**interne Extraktionskontrolle**

mit spezifischen fluorogenen Reporterfarbstoffen markierte (Oo)Zysten, die vor der Aufbereitung in einer bestimmten Anzahl zu der Probe hinzugefügt werden dürfen, um sicherzustellen, dass das Verfahren ordnungsgemäß funktioniert

3.6**Positivkontrolle**

Probe, zu der vor der Extraktion eine bestimmte Anzahl an (Oo)Zysten hinzugefügt worden ist, um nachzuweisen, dass das Verfahren nach dem Elutionsschritt wirksam funktioniert

3.7**Negativkontrolle**

Probe mit einer der untersuchten Probe gleichwertigen Menge an Material, die als frei von (Oo)Zysten angesehen und auf die gleiche Weise aufbereitet wird wie die untersuchte Probe

4 Kurzbeschreibung

Das Prinzip des Verfahrens beruht auf dem Entfernen der (Oo)Zysten von der Probe mit Hilfe von Elutionsverfahren, gefolgt von der Konzentrierung in dem Eluat durch Zentrifugieren und Isolierung durch immunomagnetische Trennung (en: immunomagnetic separation, IMS). Der Nachweis der (Oo)Zysten erfolgt durch Mikroskopie nach der Markierung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAbs), die mit einem Fluorochrom konjugiert sind.

5 Reagenzien**5.1 Reagenzien, die für das Eluieren der (Oo)Zysten von grünem Blattgemüse und von Beeren erforderlich sind**

5.1.1 Glycin-Puffer, pH-Wert 5,5 für grünes Blattgemüse, (A.2.1)

5.1.2 Glycin-Puffer, pH-Wert 3,5 für Beeren (A.2.2)

5.2 Reagenzien, die zum Konzentrieren, Fixieren, Färben, Nachweis und für die Qualitätskontrolle erforderlich sind

5.2.1 Methanol, analysenrein

5.2.2 Paramagnetische Kügelchen (Beads), gekoppelt mit Antikörpern, die für die Wände von *Cryptosporidium*-Oozysten und/oder *Giardia*-Zysten spezifisch sind