

DIN EN ISO 18744

ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2014-01-29

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Nachweis und Zählung von *Cryptosporidium* und *Giardia* in frischem
grünem Blattgemüse und Beeren (ISO/DIS 18744:2013);
Deutsche Fassung prEN ISO 18744:2013**

Microbiology of food and animal feed –
Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green
vegetables and berry fruits (ISO/DIS 18744:2013);
German version prEN ISO 18744:2013

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/DIS 18744:2013);
Version allemande prEN ISO 18744:2013

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2013-11-29 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses
Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

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

Gesamtumfang 28 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18744:2013) enthält unverändert den internationalen Norm-Entwurf ISO/DIS 18744:2013, der vom Unterkomitee SC 9 „Microbiology“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR/ABNT, Frankreich/Brasilien) erarbeitet wurde. Auf Grund des Beschlusses des CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) wird die Bearbeitung im parallelen Abstimmungsverfahren unter Federführung des ISO/TC 34/SC 9 durchgeführt.

Die zuständige Arbeitsgruppe innerhalb des CEN/TC 275 ist die Working Group WG 6 „Microbiology of the food chain“. Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für den Bereich der CEN/TC 275/WG 6 über den Arbeitsausschuss „Mikrobiologische Lebensmitteluntersuchung einschließlich Schnellverfahren“ 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*

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Nachweis und Zählung von Cryptosporidium und Giardia in frischem grünem Blattgemüse und Beeren (ISO/DIS 18744:2013)

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/DIS 18744:2013)

Microbiology of the food chain — Detection and enumeration of Cryptosporidium and Giardia in fresh leafy green vegetables and berry fruits (ISO/DIS 18744:2013)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.5a

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Geräte.....	7
7 Probenahme und Transport.....	8
7.1 Probenahme	8
7.2 Transport	8
7.3 Annahme der Proben	8
7.4 Lagerung.....	8
7.5 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	8
8 Durchführung	8
8.1 Entfernen der Parasiten von grünem Blattgemüse.....	8
8.2 Entfernen der Parasiten von Beeren	10
8.3 Immunomagnetische Trennung (en: Immunomagnetic separation, IMS).....	11
8.4 Färbung der Proben.....	11
8.5 Mikroskopie	12
8.5.1 Allgemeine Bemerkungen.....	12
8.5.2 Untersuchung der Probenpräparate mit Auflichtfluoreszenzmikroskopie.....	12
8.5.3 Untersuchung von Probenpräparaten mit DIC-Mikroskopie	15
9 Verfahren der Qualitätslenkung	16
9.1 Allgemeines.....	16
9.2 Einbeziehung und Auswertung von Kontrollen	17
9.3 Reinigung der Ausrüstung	17
10 Bekanntgabe der Ergebnisse	17
10.1 Angabe der Ergebnisse.....	17
10.2 Prüfbericht.....	18
Anhang A (normativ) Herstellung der Reagenzien.....	19
A.1 Allgemeine Reagenzien.....	19
A.2 Reagenzien für die Elution der Parasiten von Frischwaren.....	19
A.3 Reagenzien zum Einengen, Fixieren, Färben, Nachweis und für die Qualitätskontrolle	20
Anhang B (normativ) Herstellung von Suspensionen für die positive Prozesskontrolle	21
B.1 Allgemeines.....	21
B.2 Bestimmung der Konzentration von Oozysten oder Zysten in einer Stammsuspension.....	21
B.3 Leistungsdaten für die Suspensionen für die positive Prozesskontrolle.....	22
Anhang C (informativ) Mit den Verfahren erreichte prozentuale Wiederfindungsraten.....	23
Literaturhinweise	25

Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 18744:2013) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Lebensmittelerzeugnisse“ 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 18744:2013 wurde vom CEN als prEN ISO 18744:2013 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

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 den meisten Umgebungen (Austrocknung wirkt abtötend) über längere Zeiträume überleben können. Da diese Übertragungsstadien, nachstehend als (Oo)Zysten bezeichnet, in hohem Maße resistent sind gegenüber chemischen und physikalischen Verfahren, auch Chlor in Konzentrationen, wie sie für die Aufbereitung von Trinkwasser angewendet werden, sowie gegenüber Desinfektionsmitteln, die für Produkte verwendet werden, 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 dieser Erreger für Nachweiszwecke und deshalb müssen sie dafür direkt von der Lebensmittelprobe gewonnen werden, gefolgt von der Visualisierung der (Oo)Zysten durch Mikroskopie. Die im vorliegenden Dokument beschriebenen Verfahren dienen der Feststellung, ob *Cryptosporidium*- oder *Giardia*-(Oo)Zysten auf der Oberfläche von Frischwaren vorhanden sind, und deren Zählung. Diese Norm beruht auf den einzigen veröffentlichten Verfahren, die in einem multizentrischen Ringversuch geprüft wurden. Alternative Verfahren können nach einem Nachweis ihrer Gleichwertigkeit mit dieser Norm nach der in ISO 16140 beschriebenen Arbeitsvorschrift angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren fest 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. 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 oder Genogruppen einschließen, die als pathogen für den Menschen bekannt sind.

Dieses Verfahren ist nicht anwendbar zur Bestimmung der Arten oder Genotypen/Genogruppen von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten. 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, die jedoch möglicherweise nicht anwendbar sind, wenn die Proben mit positiven Prozesskontrollen beimpft (en: spiked) wurden.

Dieses Verfahren ermöglicht keine Bestimmung der Lebensfähigkeit oder Infektiosität beliebiger *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*.

ISO 16140, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

***Cryptosporidium*-Oozysten**

Übertragungsstadien von *Cryptosporidium* spp.; ihr Nachweis beruht auf der Reaktion mit spezifischen Anti-*Cryptosporidium*-Antikörpern und auf typischen morphologischen Merkmalen, wie in Abschnitt 11 der vorliegenden Internationalen Norm beschrieben

3.2

***Giardia*-Zysten**

Übertragungsstadien von *Giardia* spp.; ihr Nachweis beruht auf der Reaktion mit spezifischen Anti-*Giardia*-Antikörpern und auf typischen morphologischen Merkmalen, wie in Abschnitt 11 der vorliegenden Internationalen Norm beschrieben

3.3

frisches grünes Blattgemüse

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

3.4

frische Beeren

stammen von einer Vielzahl von Pflanzen mit kleinen Früchten, die ein hohes Verhältnis von Oberfläche zu Masse aufweisen, und die mit Ausnahme von Waschen keinem Aufbereitungsprozess unterzogen wurden

3.5

verfahrenstechnische Kontrolle der Probe

probenbezogene Prozesskontrolle

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

3.6

positive Prozesskontrolle

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

3.7

negative Prozesskontrolle

eine der Probe gleichwertige 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 aus 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 monoklonalen Antikörpern (mAb), 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 beim Konzentrieren, Fixieren, Färben, Nachweis und bei der Qualitätskontrolle verwendet werden

5.2.1 Methanol, analysenrein

5.2.2 Paramagnetische Kügelchen (Beads), zur Isolierung von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten

5.2.3 Salzsäure, 0,1 M (A.3.1)

5.2.4 Natriumhydroxid, 1 M (A.3.2)

5.2.5 Fluorochrommarkierte monoklonale Antikörper (mAb) gegen *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten

5.2.6 Immunofluoreszenz-Einbettungsmedium (A.3.3)

5.2.7 4',6'-Diamidin-2-phenylindol-Dihydrochlorid-Dihydrat (DAPI), gefriergetrocknetes Reagens

5.2.8 DAPI-Stammlösung (A.3.4)

5.2.9 DAPI-Arbeitslösung (A.3.5)

5.2.10 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (A.1.1)

5.2.11 Nicht fluoreszierendes Immersionsöl

5.2.12 Stammsuspensionen von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten (Anhang B)

5.2.13 Suspensionen von vorab markierten und gezählten lebensunfähigen *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten

Der Fluorochrommarker muss sich von dem unterscheiden, der für den Nachweis des Zielorganismus verwendet wird.

5.2.14 Parasiten-Aufbewahrungsmedium (A.3.6, A.3.7)

5.2.15 Vollentsalztes Wasser

5.2.16 Fingernagellack (zum Abdichten der Deckgläschen auf den Objektträgern, falls erforderlich)

6 Geräte

Das Verfahren erfordert die übliche mikrobiologische Laborausrüstung (siehe ISO 7218) und insbesondere Folgendes:

6.1 Pinzette (zur Handhabung von Frischwaren, falls erforderlich)

6.2 Objektträger mit Vertiefung und hydrophober Beschichtung, die Vertiefungen sind in der Lage, ein Volumen von 50 µl aufzunehmen, und Deckgläschen von geeigneter Größe

6.3 Blattmischer (Beutel-Walkmischer) und passende Filterbeutel

6.4 Ausschwingzentrifuge (zur Aufnahme von mindestens 4 konischen 50-ml-Zentrifugenröhrchen je Lauf)

6.5 Glasröhrchen nach Leighton

6.6 Rotationsmischer, kompatibel mit den Leighton-Röhrchen

6.7 Magnetischer Klemmständer, kompatibel mit den Leighton-Röhrchen

6.8 Magnetischer Klemmständer für Mikrozentrifugenröhrchen

6.9 Wärmplatte für Objektträger, Brutschrank mit einer Temperatur von 37 °C bis 42 °C oder gleichwertige Vorrichtung zum Trocknen von Objektträgern

6.10 Feuchtekammer (mit einem Deckel verschlossener Behälter, der ein Feuchtigkeit absorbierendes Material enthält, abgedunkelt aufbewahrt und bei einer Temperatur gehalten werden kann, die für das Immunofluoreszenz-Reagens geeignet ist).

6.11 Ansaugvorrichtung — Vakuumquelle, die mit einem Flüssigkeitsabscheider und einer Pipette ausgerüstet ist, oder eine gleichwertige Vorrichtung.

6.12 Auflichtfluoreszenzmikroskop mit 20fach-, 40fach-Objektiven und 100fach-Objektiv mit Immersionslinse sowie einem kalibrierten Okularraster (Gitternetz). Muss einen FITC-Filtersatz (blau, Filter für 480 nm Anregung, 520 nm Emission) und einen DAPI-Filtersatz (UV, 375 nm Anregung, > 420 nm Emission) einschließen. Wenn fluorochrommarkierte verfahrenstechnische Kontrollen der Probe verwendet werden, ist ein zusätzlicher Filtersatz erforderlich, der für das Fluorochrom geeignet ist. Zweckmäßig sind Geräte mit differentieller Interferenzkontrastoptik (DIC). Ein an das Mikroskop angeschlossenes photographisches Aufzeichnungssystem kann möglicherweise zur Aufzeichnung positiver oder mutmaßlicher Fälle angemessen sein.

6.13 FITC-Kontrollobjektträger zur Bewertung der Fluoreszenzintensität und Verifizierung der ordnungsgemäßen Leistung des optischen Systems des Fluoreszenzmikroskops.