

DIN EN ISO 23036-2



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2019-12-11

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Verfahren zum Nachweis von Anisakidae L3-Larven in Fisch und
Fischereierzeugnissen –
Teil 2: Verfahren der künstlichen Verdauung (ISO/DIS 23036-2:2019);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 23036-2:2019**

Microbiology of the food chain –

Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products –

Part 2: Artificial digestion method (ISO/DIS 23036-2:2019);

German and English version prEN ISO 23036-2:2019

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/DIS 23036-2:2019);

Version allemande et anglaise prEN ISO 23036-2:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-10-11 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe 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/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 29 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 23036-2:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 7218 siehe DIN EN ISO 7218

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahren zum Nachweis von Anisakidae L3-Larven in Fisch und Fischereierzeugnissen — Teil 2: Verfahren der künstlichen Verdauung (ISO/DIS 23036-2:2019)

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/DIS 23036-2:2019)

Microbiology of the food chain — Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products — Part 2: Artificial digestion method (ISO/DIS 23036-2:2019)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9p

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	7
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	8
7 Probenahme	8
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	10
9 Dokumentation	11
10 Angabe der Ergebnisse	11
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	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 (prEN ISO 23036-2:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 23036-2:2019 wurde von CEN als prEN ISO 23036-2:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (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 Themen 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* erarbeitet.

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

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 der Schleimhaut einbetten. Von den adulten Weibchen produzierte, nicht embryonierte Eier werden mit den Fäkalien der Meeressäuger ausgeschieden. Im Meerwasser embryonieren die Eier und Larven des ersten Stadiums (L1) entwickeln sich darin. Die Larven häuten sich und werden zu frei schwimmenden 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 Kalamare. Durch Prädation werden die Larven von Fisch zu Fisch übertragen, dabei verbleiben sie im L3-Stadium. Wenn das Wirtstier stirbt, wandern manche Larven aus der Bauchhöhle ins Muskelgewebe. Menschen sind zufällige Wirte. Sie können sich durch den Verzehr von rohen oder nicht ausreichend gegarten Fischen und Tintenfischen, die lebensfähige L3 enthalten, infizieren.

Nematoden der Familie Anisakidae sind Erreger der humanen Anisakidose, einer Krankheit, die nicht nur eine den Menschen betreffende Gefährdung der öffentlichen Gesundheit 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 wilde anadrome Fische als Zwischenwirte der Anisakidae, dagegen sind Meeressäuger die eigentlichen Wirtstiere.

Um das Risiko, dass kontaminierte Fische beim Verbraucher ankommen, auf ein Mindestmaß zu reduzieren und damit das Auftreten von humaner Anisakidose zu verhindern, werden Sichtprüfungsverfahren zum Nachweis von Anisakidaelarven in Fischen eingesetzt.

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 (siehe Abschnitt 11).

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

1 Anwendungsbereich

In diesem Teil von ISO 23036 wird ein Verfahren für den Nachweis von L3-Anisakidaelarven, die häufig in marinen und anadromen Fischen vorkommen, festgelegt. Das Verfahren kann bei frischem und/oder gefrorenem Fisch sowie bei leicht verarbeiteten Fischprodukten, wie etwa marinierten, gesalzenen oder geräucherten Fischprodukten, angewendet werden. Es ist auch als bestätigendes Verfahren bei der Sichtprüfung von inneren Organen geeignet.

Mit dem Verfahren der künstlichen Verdauung ist es möglich, parasitäre Infektionen durch Schätzen der Anzahl der in der Fischmuskulatur vorhandenen Parasiten zu quantifizieren. 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.

Mit dem Verfahren lassen sich jedoch weder Spezies noch Genotyp der nachgewiesenen Parasiten bestimmen. Hierzu muss eine endgültige Identifizierung mittels morphologischer und/oder molekularer Verfahren erfolgen.

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*

CODEX STAN 244, 2004, Standard for salted Atlantic herring and salted sprat. CODEX STAN 244-2004.

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:

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

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 künstliche Verdauungsprüfung

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. 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 Aufschluss von Muskelgewebe in einer aus Pepsin und Salzsäure bestehenden Flüssigkeit, gefolgt von Filtration und Waschen.

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.

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 Aufschluss zu vergrößern, werden die Proben vorsichtig zerkleinert. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Larven beschädigt werden. Alternativ kann ein Labor-Homogenisator (Smasher/Stomacher), der den Verdauungsprozess erleichtert, ohne die Nematodenlarven zu beschädigen, verwendet werden.

ANMERKUNG Mixen oder Wolfen sollte vermieden werden, da hierdurch die Larven beschädigt oder beeinträchtigt 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 ± 1 °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 (6.11) filtriert werden und die aufgefangenen Larven müssen mit Leitungswasser gespült werden.

4.6 Verifizierung der Ergebnisse

Bei positiven oder nicht eindeutigen Befunden sollte ein qualifiziertes Referenzlabor die *Anisakis*-Art mittels morphologischer und/oder molekularer Verfahren bestätigen und identifizieren.

5 Reagenzien

5.1 Leitungswasser.