

II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

KOMMISSION

RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 7. Juni 1984

zur Anpassung und Ergänzung der Anhänge der Richtlinie 77/96/EWG des Rates über die Untersuchung von frischem Schweinefleisch auf Trichinen bei der Einfuhr aus Drittländern

(84/319/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN
GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 77/96/EWG des Rates vom 21. Dezember 1976 über die Untersuchung von frischem Schweinefleisch auf Trichinen bei der Einfuhr aus Drittländern⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie 83/91/EWG⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 8,

in Erwägung nachstehender Gründe :

Kürzlich durchgeführte Untersuchungen haben die Erarbeitung bestimmter Methoden für den Nachweis von Trichinen in Schweinefleisch ermöglicht; diese Methoden bieten gesundheitliche Garantien, die denen der bisherigen Methoden gleichwertig sind; es empfiehlt sich daher, Anhang I der Richtlinie 77/96/EWG zu ergänzen.

Um die Durchführung der Untersuchung auf Trichinen zu erleichtern, ist den Drittländern und Mitgliedstaaten die Wahl der vorgesehenen Untersuchungsmethoden zu überlassen.

Bei den zur Zeit angewandten Methoden für die Untersuchung auf Trichinen und in bezug auf die Bedingungen, die die für den Nachweis von Trichinen zuständigen Laboratorien erfüllen müssen, sind

bestimmte Anpassungen technischer Art vorzunehmen.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Veterinärausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN :

Artikel 1

Die Richtlinie 77/96/EWG wird nach Maßgabe des Anhangs geändert.

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie spätestens am 1. Januar 1985 nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich davon in Kenntnis.

Artikel 3

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 7. Juni 1984

Für die Kommission

Poul DALSGER

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. Nr. L 26 vom 31. 1. 1977, S. 67.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 59 vom 5. 3. 1983, S. 34.

ANHANG

A. Anhang I wird wie folgt geändert :

1. Punkt II Buchstabe a) :

- Der zehnte Gedankenstrich erhält folgende Fassung :
„Stereomikroskop (für 15 bis 40fache Vergrößerung) mit ausreichender Beleuchtung” ;
- Der letzte Gedankenstrich erhält folgende Fassung :
„Verdauungsflüssigkeit folgender Zusammensetzung : 10 g Pepsin (80 E/g FIP : Fédération Internationale de Pharmacie), 5 ml HCl (mindestens 37 %), mit Leitungswasser auf 1 Liter auffüllen.”.

2. Punkt III erhält folgende Fassung :

„III. METHODE DER KÜNSTLICHEN VERDAUUNG VON SAMMELPROBEN

a) Geräte und Reagenzien

- Messer und Pinzette zur Probeentnahme ;
- Fleischwolf, möglichst mit 2- bis 3-mm-Lochscheibe ;
- 3-Liter-Erlenmeyerkolben mit einem Gummi- oder Wattestopfen ;
- konischer Scheidetrichter, mit einem Rauminhalt von 2 000 ml ;
- gewöhnliches Tischstativ mit einem A-Fuß, etwa 28 cm lang, mit einer Stange von 80 cm ;
- Stativring von etwa 10 bis 11 cm Durchmesser zum Aufsetzen auf das Stativ ;
- Stativklemme mit runden Backen (23 × 40 mm), die mit Hilfe einer Doppelmuffe aufgesetzt wird ;
- Sieb (Maschenweite 177 Mikron) von 11 cm Außendurchmesser, mit einem Drahtboden aus Messing oder rostfreiem Stahl ;
- Plastiktrichter mit mindestens 12 cm innerem Durchmesser ;
- 100-ml-Glasmeßbecher ;
- ein Stereomikroskop (für 15 bis 40fache Vergrößerung) mit ausreichender Beleuchtung, oder Trichinoskop mit waagrechttem Tisch für das Quetschglas mit ausreichender Beleuchtung ;
- bei Verwendung des Trichinoskops wird ein Larvenzählbecken verwendet, das folgendermaßen konstruiert ist :
Das Larvenzählbecken besteht aus 3 mm starken Acrylplatten und ist wie folgt zusammengesetzt :
 - i) Der Boden des Beckens beträgt 180 × 40 mm und ist in viereckige Felder eingeteilt,
 - ii) die Seiten betragen 230 × 20 mm,
 - iii) die Endstücke betragen 40 × 20 mm.Boden und Endstücke sind so zwischen die Seiten zu kleben, daß ein Becken mit zwei schmalen Griffen an beiden Seiten entsteht.
Die Oberseite des Bodens soll 7 bis 9 mm über den unteren Rand des aus den beiden Seiten und Enden gebildeten Rahmens angehoben werden. Die Teile sind mit materialgerechtem Klebstoff zu befestigen ;
- bei Verwendung eines Stereomikroskops werden einige Petrischalen mit 9 cm Durchmesser benötigt, deren Unterseite mit einem spitzen Gegenstand in quadratische Untersuchungsfelder mit je 10 mm Seitenlänge eingeteilt ist ;
- einige 10-Liter-Abfalleimer zur Verwendung bei der späteren Behandlung der Geräte mit dekontaminierenden Mitteln wie z. B. Formol und für die überschüssige Verdauungsflüssigkeit im Falle von positivem Befund ;
- konzentrierte Salzsäure (37 %) ;
- Pepsin, Stärke 1 : 10 000 NF (US National Formulary),
entsprechend 1 : 12 500 PB (British Pharmacopoea/Pharmacopoea des Vereinigten Königreichs),
entsprechend 2 000 FIP (Fédération Internationale de Pharmacie/internationale pharmazeutische Föderation) ;
- mit 50 Quadraten markierte Tablettts zur Aufnahme von Proben von je ca. 2 g Fleisch pro Markierung ;
- eine Waage mit einer Wägegenauigkeit von 0,1 g.

b) Probeentnahme

1. Bei ganzen Tierkörpern eine etwa 2 g schwere Probe aus einem Zwerchfellpfeiler am Übergang vom muskulösen in den sehnigen Teil entnehmen, bei Nichtvorhandensein der Zwerchfellpfeiler eine gleichgroße Probe aus dem Rippen- oder Brustbeinteil des Zwerchfells oder aus der Zunge bzw. Kaumuskelatur oder aus der Bauchmuskulatur.
2. Bei Fleischteilen ist eine etwa 2 g schwere, fettarme Skelettmuskelprobe, möglichst in der Nähe von Knochen oder Sehnen, zu entnehmen.

c) Methode1. i) *Vollständige Ansätze* (gleichzeitige Untersuchung von 100 Proben)

Eine Probe von etwa 1 g wird von jeder der 100 Schweineproben genommen. Die gemeinsame Probe wird einmal im Fleischwolf zerkleinert.

Man gibt das zerkleinerte Fleisch in den 3-Liter-Erlenmeyerkolben zusammen mit 7 g Pepsin, etwa 2 Liter plus 40 bis 41°C warmem Leitungswasser und 25 ml konzentrierter Salzsäure. Die Mischung wird geschüttelt, damit sich das Pepsin auflöst.

Der pH-Wert der Lösung beträgt etwa 1,5 bis 2.

— Zur Verdauung wird der Erlenmeyerkolben etwa 4 Stunden auf plus 40 bis 41°C im Brutschrank gehalten. Während des Erwärmens wird der Kolben regelmäßig geschüttelt, und zwar mindestens zweimal pro Stunde.

— Die verdaute Lösung wird durch das Sieb in den konischen 2-Liter-Scheidetrichter gefiltert und mindestens eine Stunde lang unberührt in dem Stativ gelassen.

— Insgesamt werden etwa 45 ml in einen Meßzylinder abgelassen und gleichmäßig in drei Petrischalen verteilt, deren Boden in Quadrate eingeteilt ist, d. h. je Petrischale 15 ml.

— Jede Petrischale wird unter dem Stereomikroskop sorgfältig nach Larven untersucht.

— Bei Verwendung von Larvenzählbecken werden die 45 cm³ Sediment auf 2 Larvenzählbecken verteilt und unter dem Trichinoskop untersucht.

Die Larven zeigen sich im Bodensatz als uhrenfederartig zusammengerollte Organismen. Sie sind leicht erkennbar und wickeln sich im lauwarmen Wasser oft spiralförmig auf und ab.

— Die Sedimente sollten untersucht werden, sobald sie vorbereitet sind. Die Untersuchung sollte unter keinen Umständen auf den nächsten Tag verschoben werden.

Sind die Sedimente trübe oder werden nicht innerhalb 30 Minuten nach Vorbereitung untersucht, so sind sie wie folgt zu klären: Die verbleibende Sedimentprobe von 45 ml in einen Meßzylinder gießen und 10 Minuten ruhen lassen. Danach 30 ml des Überstands absaugen und die restlichen 15 ml mit Leitungswasser auf 45 ml auffüllen. Nach einer weiteren Absetzzeit von 10 Minuten werden 30 ml des Überstands abgesaugt und die restlichen 15 ml zur Untersuchung in eine Petrischale oder ein Larvenzählbecken gegossen. Den Meßzylinder mit 10 ml Leitungswasser spülen und dieses Spülwasser ebenfalls der in der Petrischale bzw. im Larvenzählbecken befindlichen Probe hinzufügen und untersuchen.

ii) *Ansätze mit weniger als 100 Proben*

Im Bedarfsfall können bis zu 15 Proben einem Normalansatz von 100 Proben hinzugefügt und gemeinsam untersucht werden. Bei Ansätzen mit mehr als 15 und weniger als 100 Proben wird die Verdauungsflüssigkeit entsprechend der Anzahl der Proben reduziert.

2. Bei positivem oder zweifelhaftem Ausfall der Untersuchung einer Sammelprobe ist von jedem Schwein gemäß Buchstabe b) eine weitere Probe von je 20 g zu entnehmen. Die jeweils 20-Gramm-Proben von fünf Schweinen zusammenfassen und nach oben angegebenem Verfahren untersuchen. Auf diese Weise werden 20 Gruppen zu je 5 Schweinen untersucht. Werden in einer Gruppenprobe von 5 Schweinen Trichinen nachgewiesen, so ist von jedem Schwein dieser Gruppe eine weitere Probe von 20 g zu entnehmen und nach oben angegebenem Verfahren einzeln zu untersuchen."
3. Die folgenden Punkte IV, V und VI werden angefügt :
- „IV. DIE MECHANISCH UNTERSTÜTZTE METHODE DER KÜNSTLICHEN VERDAUUNG VON SAMMELPROBEN/SEDIMENTATIONSTECHNIK
- a) **Geräte und Reagenzien**
- Messer oder Schere zur Probeentnahme ;
 - Mit 50 Quadraten markierte Tablettts zur Aufbewahrung von Proben von je ca. 2 g Fleisch pro Markierung ;
 - Stomacher Lab-blender 3500 Thermo-Modell ;
 - Plastiktüten für Stomacher Lab-blender ;
 - 2 Liter fassende Scheidetrichter, möglichst mit Teflonstopfen (Sicherheitsverschluß) ;
 - Stative mit Ringen und Befestigungen ;
 - Siebe, Maschenweite 177 Mikron, Außendurchmesser 11 cm mit Maschen auf rostfreiem Stahl ;
 - Trichter mit mindestens 12 cm Innendurchmesser zum Einhängen der Siebe ;
 - 100-ml-Glasmeßbecher ;
 - ein 25-ml-Ausgabegerät ;
 - 3 Liter fassende Becher,
 - Löffel oder Glasstab für das Umrühren der Verdauungsflüssigkeit im Becher ;
 - eine Plastikspritze mit Rohr für das Absaugen ;
 - ein Meßlöffel für 6 g ;
 - ein Thermometer, das im Bereich 1-100 °C auf $\pm 0,5$ °C genau ist ;
 - ein Vibrator, z. B. ein Elektrorasierer ohne Kopf ;
 - ein Elektorelais, das jede Minute an- bzw. ausschaltet ;
 - Trichinoskop mit Horizontaltisch oder Stereomikroskop mit ausreichender Beleuchtung ;
 - ein Larvenzählbecken (bei Verwendung des Trichinoskops).
- Das Larvenzählbecken besteht aus 3 mm dicken Acrylplatten und ist wie folgt zusammengesetzt :
- i) Der Boden des Gefäßes beträgt 180 × 40 mm und ist in viereckige Felder eingeteilt,
 - ii) die Seiten betragen 230 × 20 mm,
 - iii) die Endstücke betragen 40 × 20 mm.
- Boden und Enden sind so zwischen die Seiten zu kleben, daß ein Becken mit je zwei schmalen Griffen an beiden Seiten entsteht. Die Oberseite des Bodens soll 7 bis 9 mm über den unteren Rand des aus den beiden Seiten und Enden gebildeten Rahmens angehoben werden. Die Teile sind mit materialgerechtem Klebstoff zu befestigen ;
- einige Petrischalen mit 9 cm Durchmesser (bei Verwendung des Stereomikroskops), deren Boden mit einem spitzen Gegenstand in Vierecke von 10 × 10 mm eingeteilt sind ;
 - 17,5 %ige HCl ;
 - Pepsin, Stärke 1 : 10 000 NF (US National Formulary),
entsprechend 1 : 12 500 PB (British Pharmacopoea/Pharmacopoea des Vereinigten Königreichs),
entsprechend 2 000 FIP (Fédération Internationale de Pharmacie/internationale pharmazeutische Föderation)
 - eine Reihe von 10-Liter-Gefäßen, die bei Behandlung des Geräts mit dekontaminierenden Mitteln wie z. B. Formol und für die verbleibenden Verdauungssäfte im Falle positiver Ergebnisse verwendet werden ;
 - eine auf 0,1 g genaue Waage.

b) Probeentnahme

1. Bei ganzen Tierkörpern eine etwa 2 g schwere Probe aus einem Zwerchfellpfeiler am Übergang vom muskulösen in den sehnigen Teil entnehmen, bei Nichtvorhandensein der Zwerchfellpfeiler eine gleichgroße Probe aus dem Rippen- oder Brustbeinteil des Zwerchfells oder aus der Zunge bzw. Kaumuskelatur oder aus der Bauchmuskulatur.
2. Bei Fleischteilen ist eine etwa 2 g schwere, fettarme Skelettmuskelprobe, möglichst in der Nähe von Knochen oder Sehnen, zu entnehmen.

c) Verfahren**1. Verdaunungsverfahren****i) Vollständige Ansätze (gleichzeitige Untersuchung von 100 Proben)**

- In den Stomacher Lab-blender 3500 werden zwei ineinandergesteckte Plastiktüten eingesetzt und der Temperaturanzeiger auf 40 bis 41 °C eingestellt.
- 1 ½ Liter auf plus 32 bis 35 °C vorgewärmtes Wasser werden in den inneren Plastikbeutel gegossen und das Wasser auf plus 40 bis 41 °C erhitzt.
- 25 ml einer 17,5 %igen Salzsäurelösung werden dem Wasser im Stomacher hinzugefügt.
- Von jeder Einzelprobe gemäß Buchstabe b) wird je eine Probe von ca. 1 g gefertigt und zu je 100 Stück zusammengefaßt hinzugefügt.
- Schließlich werden noch 6 g Pepsin hinzugefügt. Die Reihenfolge des Zusatzes ist streng einzuhalten, um die Zersetzung des Pepsins zu vermeiden.
- Der Stomacher bearbeitet anschließend 25 Minuten lang den Inhalt des Beutels.
- Dann wird die Plastiktüte dem Stomacher entnommen und die Verdauungsflüssigkeit durch das Sieb in einen 3-Liter-Kolben abfiltriert.
- die Plastiktüte wird mit rund 100 ml Wasser ausgewaschen, mit denen anschließend das Sieb gespült wird, und die schließlich dem Filtrat im Kolben hinzugefügt werden.

Bis zu 15 Einzelproben können einer Sammelprobe von 100 Proben hinzugefügt und zusammen mit diesen untersucht werden.

ii) Ansätze mit weniger als 100 Proben

- In den Stomacher Lab-blender 3500 werden zwei ineinandergesteckte Plastiktüten eingesetzt und der Temperaturanzeiger auf 40 bis 41 °C eingestellt.
- Die Verdauungsflüssigkeit wird durch Mischen von 1 ½ Liter Wasser und 25 ml 17,5 %iger Salzsäure hergestellt. Dann werden 6 g Pepsin hinzugefügt und das Ganze bei 40 bis 41 °C durchgemischt. Die Reihenfolge ist streng einzuhalten, um die Zersetzung des Pepsin zu vermeiden.
- Von der Verdauungsflüssigkeit wird eine Menge, die jeweils 15 ml pro Einzelprobe entspricht (z. B. für 30 Proben werden 30 × 15 ml oder 450 ml benötigt) abgemessen und in den inneren der beiden Plastikbeutel gegeben zusammen mit der vorhandenen Anzahl von Fleischproben von je ca. 1 g (bei 25 bis 30 °C), die jeder der einzelnen Proben gemäß Buchstabe b) entnommen wurden.
- Wasser von ca. 41 °C wird in den äußeren Beutel gegossen, bis in den beiden Beuteln ein Volumen von zusammen 1 ½ Litern erreicht ist.
- Der Stomacher bearbeitet dann 25 Minuten lang den Inhalt des Beutels.
- Dann wird der Plastikbeutel dem Stomacher entnommen und die Verdauungsflüssigkeit durch das Sieb in einen 3-Liter-Kolben abfiltriert.
- Der Plastikbeutel wird mit rund 100 ml Wasser ausgewaschen, mit denen anschließend das Sieb gespült wird und die dabei dem Filtrat im Kolben hinzugefügt werden.

2. Isolierung der Larven durch Sedimentation

- Eis (300 bis 400 g Eisflocken, Eispulver oder gemahlene Eis), wird der Verdauungsflüssigkeit zugesetzt, bis ein Volumen von rund 2 l erreicht ist. Die Verdauungsflüssigkeit solange rühren, bis das Eis geschmolzen ist.
Bei kleineren Probengruppen (vgl. Punkt 1. ii)) ist die Eismenge entsprechend herabzusetzen.
- Die gekühlte Verdauungsflüssigkeit wird in einen 2-Liter-Scheidetrichter, der mit einem an separater Klemme befestigten Vibrator versehen ist, abgefüllt.

- Der Scheidetrichter wird 30 Minuten lang zur Sedimentation stehengelassen, wobei 1 Minute Vibration und 1 Minute Pause abwechseln.
- Nach 30 Minuten wird eine Probe von 60 ml des Sediments schnell in einen 100 ml-Meßzylinder auslaufen gelassen. (Der Trichter wird nach Verwendung mit Seifenlösung gespült.)
- Die 60-ml-Probe wird mindestens 10 Minuten lang stehengelassen, danach wird der Überstand durch Absaugen entfernt, bis ein Volumen von 15 ml verbleibt, das auf Vorhandensein von Larven untersucht wird.
- Für das Absaugen wird eine Plastikspritze, die mit einem Plastikröhrchen versehen ist, verwendet.

Das Röhrchen soll so lang sein, daß 15 ml im Meßzylinder verbleiben, wenn beim Absaugen die Spritze auf den Zylinderstand gesetzt wird.

- Die verbleibenden 15 ml werden in ein Larvenzählbecken oder zwei Petrischalen gegossen und mit dem Trichinoskop bzw. dem Stereomikroskop untersucht.
- Die Sedimente sollten untersucht werden, sobald sie vorbereitet sind. Die Untersuchung sollte unter keinen Umständen auf den nächsten Tag verschoben werden.

Sind die Sedimente trübe oder werden nicht innerhalb 30 Minuten nach Vorbereitung untersucht, so sind sie wie folgt zu klären: Die verbleibende Sedimentprobe von 60 ml in einen Meßzylinder gießen und 10 Minuten ruhen lassen. Danach 45 ml des Überstands absaugen und die restlichen 15 ml mit Leitungswasser auf 45 ml auffüllen. Nach einer weiteren Absetzzeit von 10 Minuten werden 30 ml des Überstands abgesaugt und die restlichen 15 ml zur Untersuchung in eine Petrischale oder ein Larvenzählbecken gegossen. Den Meßzylinder mit 10 ml Leitungswasser spülen und dieses Spülwasser ebenfalls der in der Petrischale bzw. im Larvenzählbecken befindlichen Probe hinzufügen und untersuchen.

3. Bei positivem oder zweifelhaftem Ausfall der Untersuchung einer Sammelprobe ist von jedem Schwein gemäß Buchstabe b) eine weitere Probe von je 20 g zu entnehmen. Die jeweils 20-Gramm-Proben von fünf Schweinen zusammenfassen und nach oben angegebenem Verfahren untersuchen. Auf diese Weise werden 20 Gruppen zu je 5 Schweinen untersucht. Werden in einer Gruppenprobe von 5 Schweinen Trichinen nachgewiesen, so ist von jedem Schwein dieser Gruppe eine weitere Probe von 20 g zu entnehmen und nach oben angegebenem Verfahren einzeln zu untersuchen.

V. DIE MECHANISCH UNTERSTÜTZTE METHODE DER KÜNSTLICHEN VERDAUUNG VON SAMMELPROBEN „ON FILTER ISOLATION“-TECHNIK

a) Geräte und Reagenzien

Siehe Verfahren IV Buchstabe a)

Zusätzliche Geräte:

- 1-Liter-Gelman-Trichter mit Filterhalter (Durchmesser 45 mm);
- Filterscheiben. Die runden Filterscheiben bestehen aus rostfreiem Stahlmaschendraht, Weite 35 Mikron; der Durchmesser der Scheibe beträgt 45 mm. Herstellung: zwei Gummiringe aus 1 mm starkem Gummi mit äußerem Durchmesser von 45 mm und innerem Durchmesser von 38 mm. Das Drahtgewebe ist zwischen die beiden Ringe einzusetzen und mit einem Zweistufenklebstoff zu befestigen, der für beide Materialien geeignet ist;
- 3-Liter-Erlenmeyerkolben mit seitlichem Rohr zum Absaugen;
- Filterpumpe;
- 80-ml-Plastikbeutel;
- Schweißgerät für Plastikbeutel;
- Rennilase, 1 : 150 000 Soxhlet/Einheiten je g.

b) Probeentnahme

Siehe Verfahren IV Buchstabe b).

c) Verfahren :**1. Verdauungsverfahren**

i) Vollständige Ansätze (gleichzeitige Untersuchung von 100 Proben)

Siehe Verfahren IV Buchstabe c) Punkt 1. i);

ii) *Ansätze mit weniger als 100 Proben*

Siehe Verfahren IV Buchstabe c) Punkt 1. ii).

2. Isolierung der Larven durch Filtern

— Eis (300 bis 400 g Eisflocken, Eispulver oder gemahlene Eis) wird der Verdauungsflüssigkeit zugesetzt, bis ein Volumen von rund 2 Liter erreicht ist.

Bei kleineren Sammelproben ist die Eismenge entsprechend herabzusetzen.

— Die Verdauungsflüssigkeit solange rühren, bis das Eis geschmolzen ist. Die gekühlte Verdauungsflüssigkeit mindestens 3 Minuten stehen lassen, damit die Larven sich einrollen können.

— Der Gelman-Trichter mit Filterhalter wird mit einer Filterscheibe auf einen Erlenmeyerkolben montiert, der an eine Filterpumpe angeschlossen ist.

— Die Verdauungsflüssigkeit wird in den Gelman-Trichter gegossen und gefiltert. Gegen Ende des Filterungsvorgangs kann der Durchgang der Verdauungslösung durch den Filter mit Hilfe der Filterpumpe unterstützt werden. Das Absaugen sollte unmittelbar, bevor der Filter trocken wird, d. h. wenn noch 2 bis 5 ml im Trichter verbleiben, eingestellt werden.

— Wenn die gesamte Verdauungsflüssigkeit gefiltert ist, wird die Filterscheibe entfernt, in einen 80 ml Plastikbeutel gegeben, in den 15 bis 20 ml Rennilase-Lösung gegossen werden. Die Rennilase-Lösung besteht aus 2 g Rennilase in 100 ml Leitungswasser.

— Der Plastikbeutel wird zweifach verschweißt und in einen Stomacher zwischen den inneren und den äußeren Beutel gegeben.

— Der Stomacher bearbeitet dann 3 Minuten lang den Inhalt des Beutels, z. B. während er an einer vollständigen oder unvollständigen Probengruppe arbeitet.

— Nach 3 Minuten wird der Plastikbeutel zusammen mit Filterscheibe und Rennilase-Lösung aus dem Stomacher entfernt und mit einer Schere geöffnet. Die Flüssigkeit wird in ein Larvenzählbecken oder eine Petrischale gegossen. Der Beutel wird mit 5 bis 10 ml Wasser ausgewaschen, das ebenfalls in das Larvenzählbecken zur trichinoskopischen Prüfung oder in eine Petrischale zur stereomikroskopischen Untersuchung gegossen wird.

— Die Sedimente sollten untersucht werden, sobald sie vorbereitet sind. Die Untersuchung sollte unter keinen Umständen auf den nächsten Tag verschoben werden.

Bemerkung:

Die Filterscheiben dürfen nie verwendet werden, wenn sie nicht vollständig sauber sind. Die Filterscheiben dürfen nie in unsauberem Zustand trocknen.

Zum Säubern können sie über Nacht in Rennilase-Lösung gelegt werden. Vor erneuter Verwendung sollten sie im Stomacher in Rennilase-Lösung gereinigt werden.

3. Bei positivem oder zweifelhaftem Ausfall der Untersuchung einer Sammelprobe ist von jedem Schwein gemäß Buchstabe b) eine weitere Probe von je 20 g zu entnehmen. Die jeweils 20-Gramm-Proben von fünf Schweinen zusammenfassen und nach oben angegebenem Verfahren untersuchen. Auf diese Weise werden 20 Gruppen zu je 5 Schweinen untersucht. Werden in einer Gruppenprobe von 5 Schweinen Trichinen nachgewiesen, so ist von jedem Schwein dieser Gruppe eine weitere Probe von 20 g zu entnehmen und nach oben angegebenem Verfahren einzeln zu untersuchen.

VI. DAS MAGNETRÜHRVERFAHREN FÜR DIE KÜNSTLICHE VERDAUUNG VON SAMMELPROBEN**a) Geräte und Reagenzien**

— Messer und Pinzetten zur Probeentnahme ;

— Mit 50 Quadraten markierte Tablettts zur Aufbewahrung von Proben von je ca. 2 g Fleisch,

— Moulinette-Schneidegerät ;

— Magnetrührer mit temperaturgeregelter Heizplatte und teflonbeschichtetem Rührstab von ungefähr 5 cm Länge ;

- 2-Liter-Scheidetrichter ;
- Stative mit Ringen und Klammern zum Befestigen des Scheidetrichter ;
- Siebe, Maschenweite 177 Mikron, Außendurchmesser 11 cm mit Maschen aus rostfreiem Stahl ;
- Plastiktrichter mit mindestens 12 cm Innendurchmesser zum Einhängen der Siebe ;
- 3 Liter fassende Becher ;
- Meßzylinder für ca. 50 ml Inhalt oder Zentrifugierröhrchen ;
- Trichinoskop mit Horizontaltisch oder Stereomikroskop mit ausreichender Beleuchtung ;
- ein Larvenzählbecken (bei Verwendung des Trichinoskops).
Das Larvenzählbecken besteht aus 3 mm dicken Acrylplatten und ist wie folgt zusammengesetzt :
 - i) Der Boden des Gefäßes beträgt 180×40 mm und ist in viereckige Felder eingeteilt,
 - ii) die Seiten betragen 230×20 mm,
 - iii) die Endstücke betragen 40×20 mm.Boden und Enden sind so zwischen die Seiten zu kleben, daß ein Becken mit zwei schmalen Griffen an beiden Seiten entsteht. Die Oberseite des Bodens soll 7 bis 9 mm über den unteren Rand des aus den beiden Seiten und Enden gebildeten Rahmens angehoben werden. Die Teile sind mit materialgerechtem Klebstoff zu befestigen ;
- einige Petrischalen mit 9 cm Durchmesser (bei Verwendung des Stereomikroskops), deren Boden mit einem spitzen Gegenstand in Vierecke von 10×10 mm eingeteilt sind ;
- Aluminiumfolie ;
- 25%ige Salzsäure ;
- Pepsin, Stärke 1 : 10 000 NF (US National Formulary),
entsprechend 1 : 12 500 FB (British Pharmacopoea / Pharmacopoea des Vereinigten Königreichs)
entsprechend 2 000 FIP (Fédération Internationale de Pharmacie / internationale pharmazeutische Föderation) ;
- Leitungswasser, auf 46 bis 48 °C erhitzt ;
- einige 10-Liter-Gefäße, die bei Behandlung des Geräts mit dekontaminierenden Mitteln wie z. B. Formol und für die verbleibenden Verdauungssäfte im Falle positiver Ergebnisse verwendet werden ;
- eine auf 0,1 g genaue Waage.

b) Probeentnahme

1. Bei ganzen Tierkörpern eine etwa 2 g schwere Probe aus einem Zwerchfellpfeiler am Übergang vom muskulösen in den sehnigen Teil entnehmen, bei Nichtvorhandensein der Zwerchfellpfeiler eine gleichgroße Probe aus dem Rippen- oder Brustbeinteil des Zwerchfells oder aus der Zunge bzw. Kaumuskulatur oder aus der Bauchmuskulatur.
2. Bei Fleischteilen ist eine etwa 2 g schwere, fettarme Skelettmuskelprobe, möglichst in der Nähe von Knochen oder Sehnen, zu entnehmen.

c) Verfahren

1. i) *Vollständige Ansätze* (gleichzeitige Untersuchung von 100 Proben)
 - Von den gemäß Buchstabe b) gewonnenen Proben werden pro Tier 1-Gramm-Proben hergestellt, die zu einer Sammelprobe von 100 Einzelproben vereinigt und in einem Moulinette-Schneidegerät zerkleinert werden. Das Gerät ist dabei drei- bis viermal je ca. 1 Sekunde lang zu betätigen.
 - Das zerkleinerte Fleisch in einen 3-Liter-Becher geben und es mit 10 g Pepsin bestreuen. Den Becher mit 2 Liter Leistungswasser, das zuvor auf 46 bis 48° C erhitzt wurde, auffüllen und 16 ml Salzsäure hinzugeben.
 - Das Schneidewerk der Moulinette mehrfach in die Verdauungsflüssigkeit des Bechers eintauchen, um das noch anhängende Testmaterial in die Verdauungslösung zu bringen.
 - Den Rührstab in den Becher geben und diesen mit Aluminiumfolie abdecken.

- Den Becher auf die vorgewärmte Heizplatte des Magnetrührers setzen und den Rührvorgang beginnen. Vor Beginn des Rührvorgangs ist der Magnetrührer so einzustellen, daß er während des gesamten Rührvorgangs ständig eine Temperatur von 44 bis 46 °C hält. Während des Rührvorgangs sollte die Verdauungsflüssigkeit so schnell drehen, daß ein tiefer zentraler Wirbel entsteht; Spritzen ist zu vermeiden.
- Die Verdauungsflüssigkeit wird 30 Minuten lang gerührt, danach wird das Rührgerät abgeschaltet, die Verdauungsflüssigkeit durch das Sieb in den Scheidetrichter zur Sedimentation gegossen.
- Die Verdauungsflüssigkeit soll im Trichter 30 Minuten lang stehenbleiben.
- Nach 30 Minuten werden 40 ml der Verdauungsflüssigkeit schnell in einem Meßzylinder oder in ein Zentrifugierröhrchen abgelassen.
- Die 40-ml-Probe wird 10 Minuten stehen gelassen, danach werden 30 ml des Überstands durch Absaugen entfernt, so daß ein Volumen von 10 ml verbleibt.
- Diese restlichen 10 ml der abgesetzten Probe werden in ein Larvenzählbecken oder in eine Petrischale gegossen.
- Dann wird der Meßzylinder oder das Zentrifugierröhrchen mit ca. 10 ml Leitungswasser gespült und diese Flüssigkeit der im Larvenzählbecken oder in der Petrischale befindlichen Probe hinzugefügt. Danach wird die Probe mittels Trichinoskop oder Stereomikroskop untersucht.
- Die Sedimente sollten untersucht werden, sobald sie vorbereitet sind. Die Untersuchung sollte unter keinen Umständen auf den nächsten Tag verschoben werden.

Werden die Sedimente nicht innerhalb 30 Minuten nach Vorbereitung untersucht, so sind sie wie folgt zu klären: Die abgelassene Sedimentprobe von 40 ml in einen Meßzylinder gießen und 10 Minuten ruhen lassen. Danach 30 ml des Überstands absaugen und die restlichen 10 ml mit Leitungswasser auf 40 ml auffüllen. Nach einer weiteren Absetzzeit von 10 Minuten werden 30 ml des Überstands abgesaugt und die restlichen 10 ml zur Untersuchung in eine Petrischale oder ein Larvenzählbecken gegossen. Den Meßzylinder mit 10 ml Leitungswasser spülen und dieses Spülwasser ebenfalls der in der Petrischale bzw. im Larvenzählbecken befindlichen Probe hinzufügen und untersuchen.

Wird das Sediment erst bei der Untersuchung als trübe erkannt, so wird die Probe erneut in einen Meßzylinder gegossen, auf 40 ml mit Leitungswasser aufgefüllt und anschließend wie oben weiterbehandelt.

ii) *Ansätze mit weniger als 100 Proben*

Einem Normalansatz von 100 Proben können im Bedarfsfall bis zu 15 Einzelproben zu je 1 g hinzugefügt und zusammen gemäß Buchstabe c) Punkt 1.i) untersucht werden. Mehr als 15 Einzelproben sind als vollständige Sammelprobe zu behandeln, wobei bei Ansätzen mit bis zu 50 Proben die Verdauungsflüssigkeit auf einen Liter reduziert werden kann.

2. Bei positivem oder zweifelhaftem Ausfall der Untersuchung einer Sammelprobe ist von jedem Schwein gemäß Buchstabe b) eine weitere Probe von je 20 g zu entnehmen. Die jeweils 20-Gramm-Proben von fünf Schweinen zusammenfassen und nach oben angegebenem Verfahren untersuchen. Auf diese Weise werden 20 Gruppen zu je 5 Schweinen untersucht. Werden in einer Gruppenprobe von 5 Schweinen Trichinen nachgewiesen, so ist von jedem Schwein dieser Gruppe eine weitere Probe von 20 g zu entnehmen und nach oben angegebenem Verfahren einzeln zu untersuchen."

B. Anhang II Kapitel I Absatz 1 wird wie folgt geändert:

1. Buchstabe b) erhält folgende Fassung:

„b) einen ausreichend eingerichteten, verschließbaren und abdunkelbaren Untersuchungsraum, wenn mit einem Trichinoskop untersucht wird;“.

2. Buchstabe f) wird gestrichen. Die Buchstaben g), h), i), j), k), l), m) und n) werden entsprechend zu Buchstaben f), g), h), i), j), k), l) und m).

3. Der neue Buchstabe g) erhält folgende Fassung :

„g) einen Spülraum zur Reinigung und Desinfektion von Untersuchungsgerät (z. B. Probenbehälter, Kompressoren, Messer, Scheren) mit :

- Fußböden aus wasserundurchlässigem, leicht zu reinigendem und zu desinfizierendem, nicht faulem Material,
- glatten Wänden, die bis zu einer Höhe von mindestens 2 m mit einem hellen, abwaschfesten Belag oder Anstrich versehen sind.

Diese Vorkehrung ist nicht erforderlich, wenn die in Anhang I unter den Punkten II, III, IV, V, VI angegebenen Verfahren angewandt werden, sofern die Laboratorien mit einem weiten, fachgerecht installierten Ausguß versehen sind.“
