

A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products

H. Karl and M. Leinemann

Federal Research Centre for Fisheries, Hamburg
Institute of Biochemistry and Technology, Hamburg

Introduction:

Various methods are applied for the detection of nematodes in fish fillets and other fish products.

Most of the procedures base either on candling or digestion of the fish meat (VALDIMARSSON, 1985; JACKSON (1981)).

The candling procedure is a non destructive method using candling tables of various light sources and intensities. The method is often applied in the industry for routine control to remove visible nematodes in fish fillets before further processing. Candling is also recommended as official codex method for the detection of nematodes in quick frozen blocks of fish fillets (Codex, 1992). It is a very simple and inexpensive method and allows a large sample throughput, but fails for certain fishery products like fish sticks and skin-on fillets and does not yield quantitative results. In skinless fillets, only one third of all nematodes could be recognized (KARL, 1988).

The digestion procedure is based on a complete destruction of the fish tissue by means of digestive enzymes. The remaining nematodes can easily be separated and counted. The technique yields probably quantitative results and can be applied to all fishery products. However, a limitation is given by the relatively small number of samples which can be digested and by the long reaction times of several hours required to desintegrate the fish tissue.

In Germany both procedures are laid down as official methods for the detection of nematodes in certain fishery products (ANONYMUS, 1988). Following this regulation all fillets and similar products have to be inspected visually for nematodes by means of a candling technique, whereas all other products like fish balls and sticks have to be digested. The differences of recovery rates between the two methods are considered in the regulation.

For the routine control in laboratories a procedure would be desirable, which combines the speed of the candling method and the accuracy of the digestion.

This paper describes a new technique, which allows a quantitative determination of nematodes in all kinds of fish products by means of pressing the sample between two acryl glass sheets and candling under UV-light.

Modifications of the candling technique to improve the recovery rate of nematodes

The efficiency of the candling technique is limited by the low penetration of the white light into the fish muscle (HAFSTEINSSON, 1987).

Already relatively simple slicing techniques (BRATTY, 1988; KARL, 1988; POWER, 1961) can improve the recovery rates of nematodes in fish muscle considerably from 30 % up to 70 %.

The same results can be achieved by pressing whole fillets to approximately 3–4 mm thickness between two acryl glass sheets and candling the resulting presscake on a candling table with white light of 1500 lux (Table 1). The pressing technique can be used as rapid alternative to the slicing technique and offers the advantage of analysing a whole sample prior dividing of the fish fillet into subsamples.

Other authors could improve the recovery rates of nematodes in fish products by utilizing the effect of the fluorescence of dead nematodes under UV-light at 366 nm. Pippy (1970) used this phenomena to determine parasites in whole fillets and obtained recovery rates of around 60 %. However, nematodes embedded deep in the flesh could not be detected.

Bratty (1988) applied a technique where the fish flesh is homogenized with tap water. The resulting liquid homogenate is transferred into large glass dishes and the nematodes are detected and counted under UV-light.

This technique allows a quantitative determination of nematodes in lean fish but causes problems with fatty fish species like herring and mackerel.

Combining the pressing technique and the candling under UV-light leads to a simple, fast and quantitative detection method for nematodes in all kind of frozen thawed fish fillets and fishery products.

Description of the new pressing method with fluorescence detection

Fresh fillets are skinned and the flesh is placed in the middle of a plastic bag and squeezed between two 12 mm thick acryl glass sheets to a thin layer of 2–3 mm by means of a hydraulic or manual press device. The resulting press cake of the fresh fish has to be deep frozen in the plastic bag for several hours before analyzing.

Deep frozen samples can be analyzed directly after thawing and pressing. The coatings of fish portions and sticks have to be stripped off. The seize of the plastic bag depends on the seize of the sample. For herring and small saithe fillets we used plastic bags of 700 mm length and 300 mm width.

The pressed sample (in the plastic bag) is examined for nematodes under UV-light at 366 nm, either in a darkened room or in a viewing chamber. Eye protection, appropriate for the type of UV lamp should be used.

All nematodes show a brilliant white-bluish fluorescence and can be counted easily. Additionally, their position can be marked on the plastic bag which allows a later determination of their position in the flesh.

As light source commercially available blacklight-tubes were used.

Determination of recovery rates in different fish material

The recovery rate of the press-fluorescence technique in comparison to the digestion method was determined on one hundred frozen herring fillets, one hundred frozen saithe fillets (including the belly flaps) and ten fish sticks made from mince.

All samples were first analyzed by the press-fluorescence technique and then digested quantitatively.

The results are compiled in table 2.

Pressing and candling under UV-light reveals at least the same amount of nematodes in different fish tissues compared to the digestion method. Higher recovery rates were found for herring fillets and especially for fish sticks made from mince. This is not surprising, because small pieces of nematodes, which can often be found in commercially processed fillets and mince, will be completely dissolved during the digestion and are no longer detectable in the final digestion solution.

The press-candling technique, however, as a „non destructive“ method detects all nematodes, even small pieces or parts of them.

The new technique can be applied to all type of fishery products, including also intestines, provided that the nematodes show a fluorescence under UV-light. Very large fillets should be divided into halves to assure a thin press layer and fresh samples have to be frozen before examination to obtain a fluorescence of the nematodes. The method is a fast alternative to the time consuming digestion especially in all cases where large sample amounts have to be examined quantitatively.

Table 1: Recovery rates of nematodes (%) in fish fillets found by candling followed by pressing to 3–4 mm thickness and candling with white light (1500 lux) based on the number of nematodes found by the reinspection of the press cake by the digestion method

fish product	number of samples	recovery rate %	
		candling 1500 lux	pressing + candling
herring: fillet	98	10	52
saithe: fillet	20	32	74
belly flaps	27	36	76

Table 2: Number of nematodes found in fishery products applying the press-fluorescence method at 366 nm followed by the reinspection of the press cake by the digestion method

fishery products	No. of samples	number of nematodes press/fluorescence technique	number of nematodes digestion method	percent found by digestion compared to the press/fluorescence method %
		No.	No.	
herring fillet	100	25	21	84
saithe fillet	100	625	623	98
fish stick	10	17	13	76

Summary

A quantitative detection method for nematodes in fish and fishery products is described.

The technique involves pressing of the fish sample to a thin layer of a few millimetres and detection of nematodes under UV-light at 366 nm.

The recovery rates of nematodes from saithe and herring fillets and from minced meat equal or exceed those of the digestion method.

The technique is rapid and suitable for large-scale surveys of nematodes in various fishery products.

Zusammenfassung

Es wird eine einfache, schnelle und quantitative Bestimmungsmethode für Nematoden in Fischfilets und in Fischprodukten beschrieben. Das Verfahren basiert auf dem Pressen von Filets auf eine Schichtdicke von wenigen Millimetern und dem anschließenden Nachweis der fluoreszierenden Nematoden unter UV-Licht (366 nm).

Die Wiederfindungsraten bei verschiedenen Filets und für Fischmus entsprechen der Digestionsmethode bzw. liegen höher.

Das Verfahren ermöglicht eine schnelle, quantitative Bestimmung von Nematoden bei großem Probenumfang.

References:

- ANONYMOUS (1988): Vorläufiger Probennahmeplan, Untersuchungsgang und Beurteilungsvorschlag für die amtliche Überprüfung der Erfüllung der Vorschriften des § 2 Abs. 5 der Fisch-Verordnung. Bundesgesundheitsblatt 31 (12), 486–487. – BRATTY, J. (1988): A simple technique for recovering larval ascaridoid nematodes from the flesh of marine fish. J. Parasit. 74 (4), 735–737. – Codex committee on fish and fishery products (1992): Codex standard for quick frozen blocks of fish fillet, minced fish flesh and mixtures of fillets and minced fish flesh. Alinorm 93/18, Appendix XII, Bergen. – HAFSTEINSSON, H., and S. S. H. RIZVI (1987): A review of the sealworm problem: Biology, implications and solutions. J. Fd. Protect. 50, 70–84. – JACKSON, G. J., J. W. BIER, W. L. PAYNE and F. D. McCURE (1981): Recovery of parasitic nematodes from fish by digestion or elution. Appl. and Environ. Microbiol. 41 (4), 912–914. – KARL, H. (1988): Vergleich von Nachweisverfahren für Nematodenlarven. Inf. Fischw. 35 (2), 81–83. – PIPPY, J. H. (1970): Use of Ultraviolet light to find parasitic nematodes in situ. J. Fish. Res. Bd. Can. 27 (5), 963–965. – POWER, H. E. (1961): Slicing of fillets as an aid in detection and removal of codworms from Atlantic cod fillets. J. Fish. Res. Bd. Can. 18, 137–140. – VALDIMARSSON, G., H. EINARSSON and F. J. KING (1985): Detection of parasites in fish muscle by candling technique. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68 (3), 549–551.

Anschrift der Verfasser:

Bundesforschungsanstalt für Fischerei Institut für Biochemie und Technologie, Palmallee 9, D-22767 Hamburg

Erweiterte Einsatzmöglichkeiten eines modifizierten Beweglichkeitsmediums (MSRV-Medium) für den Salmonellennachweis

Von P. PLESS¹⁾, H. ASPERGER²⁾, M. SCHEIDER³⁾, E. SCHOPF¹⁾

¹⁾ Inst. für Fleischhygiene, Fleischtechnologie und Lebensmittelkunde, Vet.-med. Univ. Wien

²⁾ Inst. für Milchhygiene und Milchtechnologie, Vet.-med. Univ. Wien

³⁾ Bundesanstalt für Lebensmitteluntersuchung und -forschung, Wien

1. Einleitung

In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, neue Verfahren für den Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln zu entwickeln. Da sich herkömmliche kulturelle Nachweismethoden sehr arbeits- und zeitintensiv gestalten und ein bestimmtes Maß an mikrobiologischen Kenntnissen erfordern, gewinnen alternative Untersuchungsverfahren wie Genhybridisierung (FITTS et al., 1985; FLOWERS et al., 1987), EIA (D'Aoust et al., 1986), ELISA (EMSWEILER-ROSE et al., 1984) sowie die Impedanz- bzw. Leitfähigkeitsmessung (EASTER und GIBSON, 1985; GIBSON, 1987; SMITH et al., 1990; PLESS, 1991) an Bedeutung. Die Anwendung dieser neuen Techniken erfordert einen hohen Kostenaufwand, der jedoch nur bedingt, bei Bearbeitung einer großen Probenzahl, durch Arbeits-, Material- und Zeitersparnis, zu rechtfertigen ist. Mit dem von SMEDT und BOLDERDIJK (1986) entwickelten MSRV-Medium (modified semisolid Rappaport Vassiliadis) läßt sich auch mit einem kulturellen Verfahren eine wesentliche Zeit- und Arbeitsersparnis erzielen, ohne eine Kostensteigerung in Kauf nehmen zu müssen. Diese Methode wird schon seit längerem für die Kontrolle von Trockenmilch und Trockenmilchprodukten erfolgreich angewendet.

Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, inwieweit diese Methode für die Untersuchung von Fleisch-, Ei- und Milchprodukten auf Salmonellen, einsetzbar ist. Als Vergleich diente der ISO-Standard 6579.

Um für diese Vergleichsuntersuchung ein möglichst breites Probenspektrum vorzugeben, wurde die Arbeit in Kooperation dreier Institute (Fleischhygiene, Milchhygiene, Lebensmitteluntersuchung) durchgeführt.

2. Material und Methoden

Probenmaterial:

Fleisch und Fleischwaren, Eier und Eiprodukte, Teigwaren, Milchpulver, Käse (schmiere- und schimmelgereift mit Enterobacteriaceengehalten von <100 bis $3,5 \times 10^7$), Futtermittel sowie Kot, Lymphknoten und Tonsillen vom Schlachtschwein

Teststämme:

S. panama, subletal geschädigt, standardisiert in Kapsel zu je 5 Keimen; S. enteritidis, subletal geschädigt nach der Methode von EDEL und KAMPELMACHER (1973); S. worthington (aus einem Ringversuch); S. enteritidis (Geflügel); S. typhimurium (Geflügel); S. typhimurium (ATCC-Stamm); S. isangi (Kindernährmittel)

Methoden:

ISO/DIS 6579:

Gepuffertes Peptonwasser (Oxoid CM 509)

Rappaport Vassiliadis Soya Pepton Medium (RVS-Medium, Oxoid CM 866)

Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon (SC-Bouillon, Merck 7709)

XLD-Agar (Oxoid, CM 469)

Brillant-Grün-Agar modifiziert (PBLA-Agar, Oxoid CM 329)

Beweglichkeitsprüfung (MSRV):

Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser 16–18 h bei 37 °C

3 Tropfen der Voranreicherung auf MSRV-Agar (Oxoid CM 910; Suppl. SR 161) – Bebrütung 20–24 h bei 42 °C

Beurteilung der Schwärmzone

Bestätigung durch Latexagglutination mit H-Antigen (Salmonella

Rapid Latex Test, Oxoid F. T. 203; Microscreen-Salmonella Test,

Fa. Mercia Diagnostics) und/oder XLD-Agar

Zu beachtende Vorschriften für die Herstellung und Anwendung des Mediums:

- Agarmengen im Kolben sollten zwecks optimaler Auflösung in einem z. B. 500 ml-Kolben die Menge von 300 ml nicht überschreiten
- von 100 ml flüssigem Nährboden sollten nicht mehr als 7 Platten abgefüllt werden
- exakte Einhaltung der 42 °C Bebrütungstemperatur (Überprüfung durch verschiedene Messungen – zeitlich und räumlich)
- bei der Bebrütung sollten die Platten nicht zu hoch gestapelt werden, um eine Kondenswasserbildung der unteren Platten zu verhindern

Darstellung der Ergebnisse:

- die Anzahl aller bestätigten positiven Proben
- die Übereinstimmung der mit ISO- bzw. MSRV-Methode ermittelten positiven Befunde mit der Anzahl aller positiven Proben
- falschpositive Ergebnisse des MSRV-Mediums (bei einem den Salmonellen identem Schwärmverhalten der Kontaminanten)
- falschnegative Ergebnisse der ISO- bzw. MSRV-Methode (bezogen auf die Anzahl aller positiven Proben)

3. Ergebnisse

An drei Instituten wurden die MSRV-Methode und die ISO-Standardmethode zur Untersuchung an insgesamt 2326 Proben vergleichend eingesetzt.

In Tabellen 1 und 2 sind die Ergebnisse der Untersuchung von Trockenmilchprodukten und Rohmilchkäse dargestellt. Da in diesen Probenmaterialien natürliche Kontaminationen mit Salmonellen nur sehr selten auftreten, wurden Proben dieser Lebensmittel mit verschiedenen Salmonellenstämmen künstlich kontaminiert. Diese Vorgangsweise erlaubt auch Aussagen über die Produktivität. Bei den Trockenmilchprodukten waren die Wiederfindungsraten der Salmonellen sowohl mit der Methode der Beweglichkeitsprüfung als auch dem konventionellen kulturellen Verfahren als sehr gut zu bezeichnen. Zwischen beiden Methoden