

E DIN EN ISO 21872:2016-04 (D/E)

Erscheinungsdatum: 2016-03-25

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis von potentiell enteropathogenen *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus* (ISO/DIS 21872:2016); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 21872:2016

Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* (ISO/DIS 21872:2016); German and English version prEN ISO 21872:2016

Inhalt	Seite
Europäisches Vorwort.....	5
Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich.....	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Grundsatz.....	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium	9
4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium	9
4.4 Isolierung und Identifizierung.....	10
4.5 Bescheinigung	10
5 Nährmedien und Reagenzien	10
5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW)	10
5.2 Festes selektives Isolierungsmedium.....	10
5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar (TCBS-) -Medium.....	10
5.2.2 Zweites Medium.....	11
5.3 Kochsalz-Agar (SNA).....	11
5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase	11
5.5 Biochemische Prüfungen	11
5.6 PCR	12
6 Geräte und Glaswaren.....	12
7 Probenahme.....	13
8 Probenvorbereitung.....	13
9 Verfahrensanweisung.....	13
9.1 Untersuchungsprobe und Erstverdünnung.....	13
9.2 Primäre selektive Anreicherung	14
9.3 Sekundäre selektive Anreicherung	15
9.4 Isolierung und Identifizierung.....	15
9.5 Bescheinigung	16
9.5.1 Allgemeines	16
9.5.2 Auswahl der Kolonien zur Bestätigung und Vorbereitung von Reinkulturen.....	16
9.5.3 Prüfungen zur präsumptiven Identifizierung.....	17
9.5.4 Biochemische Bestätigung.....	17
9.5.5 PCR-Bestätigung	19

9.5.6	DNA-Extraktion	20
9.5.7	Konventionelle PCR	20
9.5.8	Real-time-PCR	21
10	Angabe der Ergebnisse	22
11	Leistungsmerkmale des Verfahrens	22
11.1	Ringversuch	22
11.2	Prüfempfindlichkeit	22
11.3	Spezifität	22
11.4	LOD50.....	22
12	Prüfbericht	22
Anhang A (normativ) Verfahrensdiagramm		23
Anhang B (normativ) Zusammenstellung und Vorbereitung des Nährmediums und der		
	Reagenzien	25
B.1	Alkalisches Peptonwasser (APW)	25
B.1.1	Zusammenstellung	25
B.1.2	Vorbereitung.....	25
B.2	Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar (TCBS-)	25
B.2.1	Zusammenstellung	25
B.2.2	Vorbereitung.....	26
B.2.3	Vorbereitung der Agarplatten.....	26
B.3	Kochsalz-Agar (SNA)	26
B.3.1	Zusammenstellung	26
B.3.2	Vorbereitung.....	26
B.3.3	Vorbereitung der Agarplatten.....	26
B.3.4	Vorbereitung der Agarschräglflächen	26
B.4	Reagenz für den Nachweis von Oxidase	27
B.4.1	Zusammenstellung	27
B.4.2	Vorbereitung.....	27
B.5	Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC)	27
B.5.1	Zusammenstellung	27
B.5.2	Vorbereitung.....	27
B.6	Arginin-Dehydroxylase-Salzmedium (ADH)	27
B.6.1	Zusammenstellung	27
B.6.2	Vorbereitung.....	27
B.7	Nachweis von β -Galactosidase	28
B.7.1	ONPG-Lösung	28
B.7.2	Pufferlösung.....	28
B.7.3	Vollständiges Reagenz	28
B.8	Salzmedium für den Nachweis von Indol	28
B.8.1	Tryptophan-Salzmedium.....	28
B.8.2	Kovacs-Reagenz	29
B.9	Alkalisches Peptonwasser	29
B.9.1	Zusammenstellung	29
B.9.2	Vorbereitung.....	29
B.10	Natriumchloridlösung	29
B.10.1	Zusammenstellung	29
B.10.2	Vorbereitung.....	29
B.11	TAE-Puffer	30
B.11.1	Zusammenstellung	30
B.11.2	Vorbereitung.....	30
Anhang C (Informativ) Konventionelle PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , direktem thermostabilem Hämolysin (<i>tdh</i>) und direktem thermostabilen verwandten Hämolysin (<i>tdh</i>), <i>Vibrio cholerae</i> und <i>Vibrio vulnificus</i>		31
C.1	Zusammenstellung des Mastermix.....	31
C.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> -Primere (konventionelle PCR).....	31

C.3	Direkte thermostabile Hämolysin (<i>tdh</i>)- und direkte thermostabile verwandte Hämolysin (<i>tdh</i>)-Gene, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -Primere (konventionelle PCR).....	31
C.4	<i>Vibrio cholerae</i> -Primere (konventionelle PCR)	32
C.5	<i>Vibrio vulnificus</i> -Primere (konventionelle PCR)	32
C.6	Wechselnde Parameter – <i>VptoxR</i> und <i>VVH</i>	32
C.7	Wechselnde Parameter – <i>prVC</i>	32
C.8	Wechselnde Parameter - <i>tdh</i> und <i>trh</i>	33
C.9	Kontrollmaterial – konventionelle PCR	33
C.10	Laborvergleichsuntersuchung	34
Anhang D (informativ) Real-time-PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , direktem thermostabilem Hämolysin (<i>tdh</i>) und <i>Vibrio vulnificus</i>		36
D.1	Zusammenstellung des Mastermix	36
D.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> - Primere und Hydrolyse-Sonden	36
D.3	Thermostabiles direktes Hämolysin (<i>tdh</i>)-Gen <i>Vibrio parahaemolyticus</i> - Primere und Hydrolyse-Sonden	36
D.4	<i>Vibrio vulnificus</i> - Primere und Hydrolyse-Sonden	37
D.5	Wechselnde Parameter	37
D.6	Kontrollmaterial – Real-time-PCR	37
Anhang E (informativ) Ergebnisse einer Laborvergleichsuntersuchung		38
Literaturhinweise		42