

E DIN EN ISO 13136-1:2024-03 (D/E)

Erscheinungsdatum: 2024-02-16

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von Shiga-Toxin bildenden Escherichia coli (STEC) - Teil 1: Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Isolierung von Shiga-Toxin bildenden Escherichia coli (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 13136-1:2024

Microbiology of the food chain - Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) - Part 1: Horizontal method for the detection and isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024); German and English version prEN ISO 13136-1:2024

Inhalt	Seite
Europäisches Vorwort.....	9
Vorwort.....	10
Einleitung.....	11
1 Anwendungsbereich.....	12
2 Normative Verweisungen.....	12
3 Begriffe.....	13
4 Kurzbeschreibung.....	13
4.1 Allgemeines.....	13
4.2 Mikrobielle Anreicherung.....	13
4.3 Nukleinsäureextraktion.....	14
4.4 Ziel-Gene.....	14
4.5 Nachweis und Isolierung.....	14
5 Kulturmedien und Reagenzien.....	15
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien.....	15
7 Probenahme.....	16
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	16
9 Durchführung.....	16
9.1 Einwaage und Erstverdünnung.....	16
9.2 Anreicherung.....	17
9.3 Nukleinsäureextraktion.....	17
9.4 Amplifikation mittels PCR (Real-time-PCR).....	17
9.4.1 Allgemeines.....	17
9.4.2 Auswertung von PCR-Ergebnissen.....	18
9.4.3 Interne Amplifikationskontrolle bei der Real-time-PCR.....	18
9.5 Isolierung der STEC-Stämme.....	18
10 Auswertung.....	21
11 Validierung des Verfahrens.....	21
12 Untersuchungsbericht.....	22
13 Qualitätssicherung.....	22
Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens.....	24
Anhang B (normativ) Kulturmedien und Reagenzien.....	25

B.1	Allgemeines.....	25
B.2	Gepuffertes Peptonwasser (BPW)	25
B.2.1	Zusammensetzung.....	25
B.2.2	Herstellung.....	25
B.3	Trypton-Galle-X-Glucuronid-Agar (TBX).....	26
B.3.1	Zusammensetzung.....	26
B.3.2	Herstellung.....	26
B.3.3	Herstellung der TBX-Agarplatten	26
B.4	Nähragar (Beispiel für ein nicht selektives Medium).....	27
B.4.1	Zusammensetzung.....	27
B.4.2	Herstellung.....	27
B.4.3	Herstellung der Nähragarplatten.....	27
B.5	Trypticase-Soja-Bouillon-Hefeextrakt (TSBYE) (optional, siehe Verfahren in Anhang F)	27
B.5.1	Zusammensetzung.....	27
B.5.2	Herstellung.....	28
B.6	Leistungsprüfung	28
Anhang C (normativ) Fließschema für die Isolierung von STEC-Stämmen.....		30
Anhang D (normativ) Primer und Sonden für die Real-time-PCR-Assays		31
D.1	Allgemeines.....	31
D.2	Primer und Sonden.....	31
Anhang E (informativ) Identifizierung von Shiga-Toxin bildenden <i>Escherichia coli</i> (STEC) durch Amplifikation von Virulenzgenen mittels Multiplex-PCR und Nachweis von PCR- Produkten mit Agarose-Gelelektrophorese		32
E.1	Allgemeines.....	32
E.2	Abkürzungen	32
E.3	Durchführung.....	32
E.3.1	Kurzbeschreibung des Verfahrens	32
E.3.2	Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien.....	33
E.3.3	Reagenzien und Medien	34
E.3.4	Sicherheits- und Schutzvorrichtungen.....	34
E.3.5	Referenzstämmen und Prozesskontrolle	34
E.3.6	Vorbereitung des PCR-Templates.....	34
E.3.7	Durchführung der PCR-Reaktion	35
E.3.8	Agarosegel-Elektrophorese	35
E.3.9	Auswertung.....	35
Anhang F (informativ) Säurebehandlung der Anreicherungskulturen		37
Anhang G (informativ) Nachweis von <i>Escherichia coli</i> , die den Stx2f-Subtyp bilden, mittels Real- time-PCR (Auszug aus dem Verfahren EURL-VTEC_Method_10 [5])		38
G.1	Allgemeines.....	38
G.2	Real-time-PCR für den Nachweis von <i>stx2f</i>	38
G.3	Isolierung von Stx2f-bildenden <i>E.-coli</i> -Stämmen.....	39
Literaturhinweise		41

Bilder

Bild A.1	— Diagramm des Verfahrens zum Nachweis von Shiga-Toxin bildenden <i>Escherichia coli</i> (STEC)	24
Bild C.1	— Ablaufschema des Verfahrens zur Isolierung von STEC-Stämmen.....	30
Bild G.1	— Fließschema des Verfahrens.....	40

Tabellen

Tabelle 1 — Empfindlichkeit der Real-time-PCR-Assays für <i>stx1/stx2</i> nach Bebrütung von Anreicherungskulturen bei zwei Temperaturen (Screening-Schritt).....	21
Tabelle 2 — Für den Isolierungsschritt berechnete Empfindlichkeit.....	22
Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien und Reagenzien.....	28
Tabelle D.1 — Degenerierte Primer und Sonden, die für 5'-Nuklease-PCR-Assays verwendet werden	31
Tabelle E.1 — Amplifikationsfragmente der zu erwartenden Größe	36
Tabelle G.1 — Primer und TaqMan®^a-Sonde, die für die vom EURL für <i>E. coli</i> entwickelte 5'-Nuklease-PCR-Assays verwendet werden	38
Tabelle G.2 — Primer für den Nachweis des <i>stx2f</i>-Subtyps in gepoolten oder einzelnen Kolonien	39