

DIN EN ISO 10272-2:2023-07 (D)

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. - Teil 2: Koloniezählverfahren (ISO 10272-2:2017 + Amd 1:2023); Deutsche Fassung EN ISO 10272-2:2017 + A1:2023

| Inhalt | Seite |
|---|-------|
| Europäisches Vorwort..... | 10 |
| A1 Europäisches Vorwort der Änderung 1..... | 11 |
| Vorwort..... | 12 |
| A1 Vorwort der Änderung 1..... | 13 |
| Einleitung..... | 14 |
| 1 Anwendungsbereich..... | 15 |
| 2 Normative Verweisungen..... | 15 |
| 3 Begriffe..... | 15 |
| 4 Kurzbeschreibung..... | 16 |
| 4.1 Allgemeines..... | 16 |
| 4.2 Herstellung von Verdünnungen..... | 16 |
| 4.3 Zählung..... | 16 |
| 4.4 Bestätigung..... | 16 |
| 5 Nährmedien und Reagenzien..... | 17 |
| 6 Geräte und Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| 7 Probenahme..... | 17 |
| 8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe..... | 18 |
| 9 Durchführung..... | 18 |
| 9.1 Prüfmenge, Erstverdünnung und weitere Verdünnungen..... | 18 |
| 9.2 Beimpfung und Bebrütung..... | 18 |
| 9.3 Zählung charakteristischer Kolonien..... | 18 |
| 9.4 Bestätigung von <i>Campylobacter</i> | 19 |
| 9.4.1 Allgemeines..... | 19 |
| 9.4.2 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung..... | 19 |
| 9.4.3 Untersuchung der Morphologie und Beweglichkeit..... | 19 |
| 9.4.4 Untersuchung des aeroben Wachstums bei 25 °C..... | 20 |
| 9.4.5 Nachweis von Oxidase-Aktivität..... | 20 |
| 9.4.6 Auswertung..... | 20 |
| 9.5 Identifizierung von <i>Campylobacter</i> -Spezies (optional)..... | 20 |
| 9.5.1 Allgemeines..... | 20 |
| 9.5.2 Nachweis von Katalase-Aktivität..... | 20 |
| 9.5.3 Nachweis der Hydrolyse von Hippurat..... | 21 |
| 9.5.4 Nachweis der Hydrolyse von Indoxylacetat..... | 21 |
| 9.5.5 Auswertung..... | 21 |
| 10 Angabe der Ergebnisse..... | 22 |
| 11 Leistungsmerkmale des Verfahrens..... | 22 |
| 11.1 Ringversuch..... | 22 |
| 11.2 Wiederholgrenze..... | 22 |
| 11.3 Vergleichsgrenze..... | 23 |

| | | |
|-------|---|----|
| 12 | Untersuchungsbericht..... | 24 |
| | Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens..... | 25 |
| | Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien..... | 26 |
| B.1 | Allgemeines..... | 26 |
| B.2 | Verdünnungsmittel..... | 26 |
| B.3 | Modifizierter Aktivkohle-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar (mCCD-Agar)..... | 26 |
| B.3.1 | Grundmedium..... | 26 |
| B.3.2 | Antibiotische Lösung..... | 27 |
| B.3.3 | Vollständiges Medium..... | 27 |
| B.4 | Columbia-Blut-Agar..... | 28 |
| B.4.1 | Grundmedium..... | 28 |
| B.4.2 | Steriles Schafs- oder Pferdeblut..... | 28 |
| B.4.3 | Vollständiges Medium..... | 28 |
| B.5 | Reagens für den Nachweis von Oxidase-Aktivität..... | 28 |
| B.5.1 | Zusammensetzung..... | 28 |
| B.5.2 | Herstellung..... | 29 |
| B.6 | Reagens für den Nachweis von Katalase-Aktivität..... | 29 |
| B.6.1 | Zusammensetzung..... | 29 |
| B.6.2 | Herstellung..... | 29 |
| B.7 | Reagenzien für den Nachweis der Hydrolyse von Hippurat..... | 29 |
| B.7.1 | Natriumhippuratlösung..... | 29 |
| B.7.2 | Ninhydrinlösung, Massenanteil von 3,5 %..... | 29 |
| B.8 | Indoxylacetat-Plättchen..... | 30 |
| B.8.1 | Zusammensetzung..... | 30 |
| B.8.2 | Herstellung..... | 30 |
| B.9 | Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien..... | 30 |
| | Anhang C (informativ) Untersuchungen zur Verfahrensvalidierung und Leistungsmerkmale..... | 32 |
| | Anhang D (informativ) Multiplex-Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp..... | 37 |
| D.1 | Allgemeines..... | 37 |
| D.2 | Kurzbeschreibung..... | 37 |
| D.3 | Reagenzien..... | 37 |
| D.3.1 | Reagenzien für die Nukleinsäure-Extraktion..... | 37 |
| D.3.2 | Reagenzien für die Real-Time-PCR..... | 37 |
| D.4 | Geräte..... | 38 |
| D.4.1 | Für die Nukleinsäure-Extraktion verwendete Ausstattung..... | 38 |
| D.4.2 | Für die Real-Time-PCR verwendete Ausstattung..... | 38 |
| D.5 | Durchführung..... | 39 |
| D.5.1 | Nukleinsäure-Extraktion..... | 39 |
| D.5.2 | PCR-Ansatz..... | 39 |
| D.5.3 | PCR-Kontrollen..... | 40 |
| D.5.4 | Temperatur-Zeit-Programm..... | 40 |
| D.6 | Auswertung der Ergebnisse..... | 40 |
| D.7 | Leistungsmerkmale des Verfahrens..... | 40 |
| D.7.1 | Allgemeines..... | 40 |
| D.7.2 | Theoretische Bewertung des Verfahrens..... | 41 |
| D.7.3 | Inklusivität und Exklusivität..... | 41 |
| | Anhang E (informativ) PCR-Verfahren zur molekularen Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp..... | 42 |
| E.1 | Allgemeines..... | 42 |
| E.2 | Gelbasiertes Multiplex-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp..... | 42 |
| E.2.1 | Allgemeines..... | 42 |
| E.2.2 | Kurzbeschreibung..... | 42 |
| E.2.3 | Reagenzien..... | 42 |

| | | |
|--|--|----|
| E.2.4 | Geräte | 44 |
| E.2.5 | Durchführung | 45 |
| E.2.6 | Auswertung der Ergebnisse | 48 |
| E.2.7 | Leistungsmerkmale | 49 |
| E.3 | Multiplex-Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp..... | 50 |
| E.3.1 | Allgemeines..... | 50 |
| E.3.2 | Kurzbeschreibung..... | 50 |
| E.3.3 | Reagenzien | 50 |
| E.3.4 | Geräte..... | 52 |
| E.3.5 | Durchführung | 52 |
| E.3.6 | Auswertung der Ergebnisse | 54 |
| E.3.7 | Leistungsmerkmale | 54 |
| Anhang F (informativ) Untersuchungen zur Verfahrensvalidierung und Leistungsmerkmale | | 56 |
| F.1 | Ringversuch zum Multiplex-Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. (siehe Anhang D) | 56 |
| F.2 | Ringversuch zum gelbasierten Multiplex-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. (siehe Abschnitt E.2)..... | 56 |
| F.3 | Ringversuch zum Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. (siehe Abschnitt E.3) | 58 |
| Literaturhinweise | | 59 |

Bilder

| | | |
|----------|--|----|
| Bild A.1 | — Fließschema des Verfahrens zur Zählung von <i>Campylobacter</i> in der Lebensmittelkette | 25 |
|----------|--|----|

Tabellen

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1 | — Eigenschaften von <i>Campylobacter</i> | 20 |
| Tabelle 2 | — Eigenschaften von <i>Campylobacter</i> -Spezies..... | 22 |
| Tabelle B.1 | — Leistungsprüfung von Nährmedien für <i>Campylobacter</i> | 31 |
| Tabelle C.1 | — Ergebnisse der Datenanalyse, erhalten mit Blinddarm-Material von Masthähnchen..... | 32 |
| Tabelle C.2 | — Ergebnisse der Datenanalyse, erhalten mit gefrorenem Spinat | 33 |
| Tabelle C.3 | — Ergebnisse der Datenanalyse, erhalten mit gefrorenem Hackfleisch (Schwein/Rind) | 34 |
| Tabelle C.4 | — Ergebnisse der Datenanalyse, erhalten mit Rohmilch..... | 35 |
| Tabelle C.5 | — Ergebnisse der Datenanalyse, erhalten mit Hühnerhaut..... | 36 |
| Tabelle D.1 | — Sequenzen von Oligonukleotiden..... | 38 |
| Tabelle D.2 | — Reagenzien..... | 39 |
| Tabelle D.3 | — Temperatur-Zeit-Programm..... | 40 |

| | |
|--|-----------|
| Tabelle D.4 — Inklusivität und Exklusivität..... | 41 |
| Tabelle E.1 — Sequenzen von Oligonukleotiden | 43 |
| Tabelle E.2 — Reagenzien | 46 |
| Tabelle E.3 — Temperatur-Zeit-Programm | 47 |
| Tabelle E.4 — Größe von Amplifikationsprodukten | 48 |
| Tabelle E.5 — Inklusivität und Exklusivität..... | 49 |
| Tabelle E.6 — Sequenzen von Oligonukleotiden | 51 |
| Tabelle E.7 — Reagenzien | 53 |
| Tabelle E.8 — Temperatur-Zeit-Programm | 54 |
| Tabelle E.9 — Inklusivität und Exklusivität..... | 55 |
| Tabelle F.1 — Daten aus dem Ringversuch | 56 |
| Tabelle F.2 — Inklusivität und Exklusivität | 56 |
| Tabelle F.3 — Daten aus dem Ringversuch | 57 |
| Tabelle F.4 — Inklusivität und Exklusivität | 57 |
| Tabelle F.5 — Daten aus dem Ringversuch | 58 |
| Tabelle F.6 — Inklusivität und Exklusivität | 58 |