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 *Campylobacter* ... 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 *Campylobacter*-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 Vergleichgrenze ... 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 *Campylobacter* 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 *Campylobacter* spp ... 42
E.1 Allgemeines ... 42
E.2 Gelbasiertes Multiplex-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten *Campylobacter* 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 *Campylobacter* 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 *Campylobacter* spp. (siehe Anhang D) ... 56
F.2 Ringversuch zum gelbasierten Multiplex-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten *Campylobacter* spp. (siehe Abschnitt E.2) ... 56
F.3 Ringversuch zum Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten *Campylobacter* spp. (siehe Abschnitt E.3) ... 58

Literaturhinweise ... 59

Bilder

Bild A.1 — Fließschema des Verfahrens zur Zählung von *Campylobacter* in der Lebensmittelkette ... 25

Tabellen

Tabelle 1 — Eigenschaften von *Campylobacter* ... 20

Tabelle 2 — Eigenschaften von *Campylobacter*-Spezies ... 22

Tabelle B.1 — Leistungsprüfung von Nährmedien für *Campylobacter* ... 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**